بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

تخلیص پروتئین نوترکیب *PEP* P از باکتری E.*coli*

استادان راهنما:

دکتر کامران قائدی

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

استادان مشاور:

دکتر سید مسعود هوشمند

دکتر سید رسول ذاکر

پژوهشگر:

لادن یاری

شهریورماه ۱۳۸۸

هزینه های مصرفی این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره

۸۶/۳۲۷۱۲ پ ر الف مورخ ۸۷/۶/۱۹

از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

چکیده

در این دهه که دوران تحقیقات در زمینه پساژنومی[۱] است و اگرچه اغلب بانک های ژنومی مملو از اطلاعات ژنتیکی موجودات مختلف است هنوز عملکرد و محصولات اغلب ژن ها ناشناخته است. امروزه دانش پروتئومیکس پیشرفت شگرفی در زمینه مطالعه فعالیت محصولات ژنی داشته و بعنوان ابزاری توانمند در عرصه درک و شناخت عملکرد ژن ها مدنظر قرار گرفته است. هدف از این بررسی بهینه سازی شرایط لازم جهت تولید پروتئین نوترکیب پراکسیزومی موشی (PEP) در گونه مناسب و مستعد شده از کلی باسیل[۲] به نام BL۲۱ میباشد. پروتئین نوترکیب PEP در مراحل بعد خالص شده و بعنوان بخشی از مطالعات پروتئومیکسی جهت شناسایی اجزاء سلولی واکنش دهنده با آن به کار خواهد رفت.

در این بررسی وکتور بیان شونده در اشرشیاکلی (pGEX۶P۲) که در آن ژن PEP در مجاورت ژن GST (گلوتاتیون-S- ترانسفراز) دست ورزی و قرار داده شده است به کارگرفته شد. وکتورهای نوترکیب به درون سلول های BL۲۱ که سلول های باکتریائی مناسب جهت بیان پروتئین نوترکیب میباشند، ترانسفورم شدند. سلول های باکتریائی بطور مجزا GST و پروتئین نوترکیب متصل به GST را تحت رقت ۲۰۰۰ برابر در محیط ۲YT بیان کردند.بعد از ۳ ساعت کشت در دمای ۳۷°c ، ایزوپروپیل تیوگالاکتوزیداز (IPTG) در غلظت های مختلف به محیط کشت اضافه شد. در گام بعدی کشت باکتری ها در دماهای مختلف تا رسیدن به میزان رشد مناسب بررسی شد. در نهایت مجدداً سلول ها در ۶۰۰µl ازمحلول تریس بافری

(Tris-HCl (PH: ۷.۵ حاوی محلول ۱میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) ، در حضور غلظت های مختلف Triton X-۱۰۰ یا NP۴۰ سوسپانسیونه شدند و سپس سونیکیت شدند. عملکرد سونیکیشن با توان و پروب های مختلف اولتراسوند صورت گرفت. لیزات سلولی سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت حاصله جمع آوری وبا ۱۵µl ازسوسپانسیون ٪۵۰ گلوتاتیون سفاروزدر ۴°c برای ۳ ساعت انکوبه شدند. ذرات گلوتاتیون سفاروز ۳ بار با بافر شستشو و در آن مجدداً سوسپانسیونه شده ودر الکتروفورز SDS-PAGE بکار گرفته شدند. جهت تشخیص و شناسایی باندهای پروتئینی ژل ها با رنگ کوماسی برلیانت (CBB) رنگ آمیزی شدند. بهینه ترین حالت برای بیان ژن و تولید پروتئین نوترکیب PEP در غلظت µgr/ml ۰.۱ از IPTG در کشت شبانه باکتری بدست آمد. ما هیچ تفاوت معنا داری در بکارگیری TritonX۱۰۰ یا NP۴۰ بعنوان شوینده های حلال گر مشاهده نکردیم، هر جند که بهترین غلظت برای هر دو شوینده (v/v) ٪۰/۱ مشخص شد. بعلاوه مناسب ترین شرایط سونیکاسیون جهت تخریب بقایای دیواره سلولی باکتری ۳۴۰ پالس در ۵ دقیقه با شدت ٪۶۰ در هر Cycle به دست آمد.

کلمات کلیدی:

پروتئومیکس _ پروتئین پراکسیزومی موشی(PEP)_ پروتئین نوترکیب _ باکتری کارا شده_گلوتاتیون سفاروز.

---

۱. Post Genomic Era
۲. Eshrishia Coli

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول:مقدمه

۱-۱-کشف پراکسی زوم ۱
۱-۲- عملکرد پراکسی زوم ۲
۱-۳ - ساختمان پراکسی زوم ۳
۱-۴- انتقال انواع پروتئین ها به داخل پراکسی زوم ۴
۱-۵- مکانیسم ورود پروتئین های غشای پراکسی زومی ۵
۱-۶- ورود پروتئین ها به ماتریکس پراکسی زوم ۷
۱-۷- انتقال لیپیدها به پراکسی زوم ۸
۱-۸- بیوژنز پراکسی زوم ۹
۱-۹- تکثیر پراکسی زوم ۹
۱-۱۰- بیماری های پراکسی زومی ۹
۱-۱۱- پراکسی زوم و پیری ۱۰
۱-۱۲ - پروتئین PEP ۱۱
۱-۱۳- کشت سلول و رده‌های سلولی ۱۲
۱-۱۳-۱- سلول های باکتریایی مستعد به بیان ژن $BL۲۱$ ۱۴
۱-۱۳-۲- سلول های بنیادی جنینی ۱۴
۱-۱۳-۳- سلول های بنیادی جنینی موشی $RB۱$(Royan B۱) ۱۸
۱-۱۴- تکنیک ترانسفورماسیون ۱۸
۱-۱۴-۱- ترانسفورماسیون و پایداری آن ۲۰
۱-۱۵- دانش پروتئومیکس ۲۰
۱-۱۶- نحوه خالص سازی پروتئین ها ۲۱
۱-۱۶-۱- تخلیص پروتئین های دارای لیگاند ۲۲
۱-۱۶-۲- تکنیک کروماتوگرافی ۲۳
۱-۱۷- آنالیز و بررسی برهمکنش پروتئین ها با یکدیگر ۲۳
۱-۱۷-۱- گلوتاتیون S– -ترانسفراز ۲۴

عنوان **صفحه**

۱-۱۷-۲- تخلیص و آنالیز برهمکنش پروتئین ها از طریق الحاق با یک پروتئین کوچک به نام GST..۲۵

۱-۱۸- اهداف.....۲۶

فصل دوم:مواد و روش ها

۲-۱- تجهیزات و دستگاهها ۲۷

۲-۲- مواد مصرفی و نحوه ساخت.....۲۸

۲-۲-۱- سویه های باکتری ۲۸

۲-۲-۲- وکتور ۲۹

۲-۲-۳- محیط‌های کشت.....۳۰

۲-۲-۳-۱- محیط کشت باکتریایی۲YT.....۳۱

۲-۲-۳-۲- محیط کشت باکتریایی LB.....۳۱

۲-۲-۳-۳- محیط کشت باکتریایی SOB.....۳۲

۲-۲-۳-۴- محیط های لازم جهت کشت سلول های بنیادی جنینی موشی RB۱.....۳۲

۲-۲-۴- آنتی‌بیوتیک ۳۴

۲-۲-۵-بافر مخصوص تخریب دیواره سلولی با امواج صوتی(بافر سونیکاسیون) ۳۴

۲-۲-۵-۱ بافر مخصوص جداسازی بخش های مختلف سلول (بافر جداسازی فراکسیون).....۳۵

۲-۲-۶- الکتروفورز ژل پلی اکریل امید- سدیم دودسیل سولفات ۳۶

۲-۲-۶-۱- بافر الکتروفورز Glycine ۵X-Tris.....۳۶

۲-۲-۶-۲- استوک اکریل امید- بیس اکریل امید٪۳۰.....۳۶

۲-۲-۶-۳- لودینگ بافر ۳۶

۲-۲-۶-۴- مارکرهای اندازه پروتئین.....۳۷

۲-۲-۶-۵- محلول ٪۱۰ آمونیوم پرسولفات ۳۷

۲-۲-۷- تکنیک وسترن بلات ۳۷

۲-۲-۷-۱- تکنیکSDS-PAGE.....۳۷

۲-۲-۷-۲- تکنیک لکه گذاری ۳۸

۲-۲-۷-۲-۱- بافر انتقال.....۳۸

۲-۲-۷-۲-۲- فعال سازی غشاء پلی ونیلیدن دی فلوراید ۳۸

۲-۲-۷-۳- تکنیک بلوکه کردن غشاء ۳۹

عنوان **صفحه**

۲-۲-۷-۳-۱- بلوکه کننده ۳۹
۲-۲-۷-۳-۲- بافر شستشو ۳۹
۲-۲-۷-۴- انکوباسیون با آنتی بادی اولیه (آنتی GST) ۳۹
۲-۲-۷-۵- انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه (آنتی mouse) ۴۰
۲-۲-۷-۶- ردیابی محل حضور پروتئین نوترکیب متصل به GST ۴۰
۲-۲-۷-۷- تکنیک دات بلات ۴۰
۲-۳- روش ها و تکنیک ها ۴۱
۲-۳-۱- طراحی ساختار ۳D پروتئین نوترکیب PEP با بهره گیری از تکنیک های بیوانفورماتیکی. ۴۱
۲-۳-۲- ساخت سلول های بیانی پروکاریوتی *BL* ۲۱ ..... ۴۱
۲-۳-۳- تکنیک ترانسفورماسیون ۴۲
۲-۳-۴- تکنیک خالص سازی از طریق گلوتاتیون-S-ترانسفراز ۴۳
۲-۳-۴-۱- کشت سلول های باکتریایی ترانسفورم شده ۴۵
۲-۳-۴-۲- القاء بیان پروتئین نوترکیب در سلول های باکتریایی ترانسفورم شده ۴۵
۲-۳-۴-۳- تخریب دیواره سلول های باکتریایی با تکنیکی بر پایه امواج صوتی(Sonication) ۴۶
۲-۳-۴-۴- آماده سازی سازی ماتریکس گلوتاتیون سفاروز ٤B ۴۷
۲-۳-۵- تکنیک های شناسایی و اثبات تخلیص پروتئین ۴۸
۲-۳-۵-۱-تکنیک SDS-PAGE ۴۸
۲-۳-۵-۱-۱- رنگ‌آمیزی کوماسی بلو ۵۰
۲-۳-۵-۱-۲- رنگ‌آمیزی نیترات نقره ۵۱
۲-۳-۵-۱-۳- انجام Elution و جداکردن پروتئین نوترکیب الحاقی از ماتریکس گلوتاتیون سفاروز ۵۳
۲-۳-۵-۲- تکنیکWestern Blot ۵۳
۲-۳-۵-۲-۱- تکنیکSDS-PAGE ۵۴
۲-۳-۵-۲-۲- انتقال نمونه از ژل به غشاء ۵۴
۲-۳-۵-۲-۳- بلوکه کردن غشاء ۵۵
۲-۳-۵-۲-۴- رنگ‌آمیزی با آنتی بادی اولیه و ثانویه ۵۶
۲-۳-۵-۲-۵- ردیابی محل حضور شناساگر متصل به آنتی بادی ثانویه ۵۷
۲-۳-۵-۲-۶- تکنیکDot Blot ۵۸

عنوان **صفحه**

۲-۳-۶- تکنیک بررسی برهمکنش های میان پروتئین های سلولی با پروتئین نوترکیب متصل به GST۵۸

۲-۳-۶-۱- تهیه اجسام شبه جنینی از سلول های بنیادی جنینی موشی RB۱ ..... ۶۰

۲-۳-۶-۲- تمایز سلول های بنیادی جنینی موشی RB۱ به سمت عصب ۶۱

۲-۳-۶-۳- تهیه هموژنات سلولی از سلول های تمایز یافته و نحوه جداسازی فراکسیون هسته ای از سایر اندامک ها و سیتوزول ۶۲

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- پیش بینی ساختار ^{3}D پروتئین نوترکیب PEP با کمک تکنیک های بیوانفورماتیکی ۶۴

۳-۲- ساخت سلول های کارا به بیان ژن از خانواده *BL۲۱* و تهیه ترانسفورم از پلاسمید های حامل cDNAی، GST-PEP و پلاسمید pGEX۶p۲ ..... ۶۶

۳-۲-۱- ساخت سلول های BL۲۱ و تعیین میزان کارایی آنها ۶۶

۳-۲-۲-بررسی سلول های BL۲۱ ایجاد شده از نظر عدم آلودگی ۶۷

۳-۳- بهینه سازی شرایط کشت و تخلیص پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP ۶۷

۳-۳-۱- تعیین دمای مناسب جهت کشت ترانسفورم ها برای به دست آوردن بهترین بیان ازپروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP به صورت محلول ۶۷

۳-۳-۲- بررسی غلظت مناسب از IPTG جهت القاء و به دست آوردن بهترین بیان از پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP ۶۹

۳-۳-۳- انتخاب شوینده مناسب از میان Triton X-۱۰۰ و NP۴۰ جهت حذف بقایای دیواره سلولی باکتری و رهایش بهتر پروتئین های سیتوزولی ۷۰

۳-۳-۴- آنالیز نهایی تخلیص پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP از طریق رنگ آمیزی کوماسی بلو ونیترات نقره و به طور اختصاصی تر با انجام وسترن بلات ۷۱

۳-۴- بررسی پروتئین های برهمکنش کننده با پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP از رده سلول های بنیادی جنینی موشی RB۱ ..... ۷۲

۳-۴-۱- تهیه اجسام شبه جنینی ۷۲

۳-۴-۲-بررسی پروتئین های برهمکنش کننده با پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP با تکنیک SDS-PAGE ۷۳

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- بحث ۷۵

۴-۲- مطالعات گذشته صورت گرفته روی ژن P*EP* ۷۶

۴-۲-۱-کلونینگ ژن P*EP* ۷۶

۴-۲-۲- ساخت وکتور های بیانی حامل cDNAی P*EP* ۷۶

۴-۲-۳- ایجاد جهش هدفمند در ساختار ژن *PEP* و شناسایی مرحله بیان افزایش یافته P*EP* در سلول های بنیادی جنینی موشی RB۱ ..... ۷۹

۴-۳-تخلیص پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP ۸۰

۴-۴-آنالیزپروتئین های موجود در سلول ها بنیادی RB۱ تمایز یافته به سمت عصب و شناسایی پروتئین های برهمکنش کننده از آن با پروتئین نوترکیب پراکسی زومیPEP ۸۰

۴-۵- پروتئین PEP ۸۱

۴-۵-۱- دامنه فیبرونکتین نوع ۳ (FNIII) در پروتئین PEP ۸۱

۴-۵-۲- دامنه‌های آبگریز پروتئین PEP ۸۲

۴-۵-۳- سیگنال هدایتی نوع۱ (PTS۱) در پروتئین PEP ۸۲

۴-۶- نتیجه‌گیری کلی ۸۲

منابع و مآخذ ۸۴

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۱-۱- بیماری های وراثتی پراکسی زومی ۱۰
جدول ۱-۲- معرفی برخی از رده‌های سلولی نامیرا ۱۳
جدول ۲-۱- دستگاههای مورد نیاز ۲۷
جدول ۲-۲- فرمول محیط کشت ۲YT ۳۱
جدول ۲-۳- فرمول محیط کشت LB ۳۱
جدول ۲-۴- فرمول محیط کشت SOB ۳۲
جدول ۲- ۵- فرمول محیط Incompelete ۳۳
جدول ۲-۶- فرمول محیط Semi complete ۳۳
جدول ۲-۷- غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها برای انتخاب سوش های مقاوم ۳۴
جدول ۲-۸- فرمول ترکیبات لازم برای تهیه بافر سونیکاسیون ۳۵
جدول ۲-۹- فرمول تهیه Sample Buffer ۳۷
جدول ۲-۱۰- فرمول تهیه Washing Buffer ۳۹
جدول ۲-۱۱- حجم مواد مورد نیاز برای به دست آوردن مقادیر مختلف از پروتئین های نوترکیب ۴۷
جدول ۲-۱۲- فرمول ترکیبات ژل های ٪۱۲ و ٪۵ برای تهیه ۲ مینی ژل ۵۰
جدول ۲-۱۳- فرمول تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی ۵۰
جدول ۲-۱۴- فرمول تهیه محلول رنگ بر ۵۰
جدول۲-۱۵- فرمول تهیه محلول تثبیت کننده در رنگ آمیزی نقره ۵۲
جدول۲-۱۶- فرمول تهیه محلول های رنگ آمیزی نقره، حساس گر، ظهور و پایان دهنده ۵۲

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱- ورود پروتئین های غشاء پراکسی زومی.....۶

شکل ۱-۲- نمای شماتیک مدلهای رفت و برگشتی ۸

شکل ۱-۳- درجه بندی سلول های بنیادی.....۱۵

شکل ۱-۴- منشا پیدایش رده سلول های بنیادی جنینی و چندخاصیتی موش ۱۷

شکل ۱-۵- نمای شماتیک ترانسفورماسیون، تشخیص و جداسازی سلول های ترانسفورم شده.....۱۹

شکل ۲-۱- نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pGEX٦p٢.....۲۹

شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی وکتور بیانیpGEX٦p٢/PEP ۳۰

شکل ۲-۳- پروتوکل شماتیک از نحوه بیان وتخلیص پروتئین نوترکیب GST-PEP ۴۵

شکل ۲-۴- نمای کلی از ماتریکس متصل به گلوتاتیون و نحوه اتصال پروتئین نوترکیب به ذرات ماتریکس از طریق لیگاند گلوتاتیون-S-ترانسفراز ۴۷

شکل ۲-۵- پروتوکل نحوه آنالیز برهمکنش های میان PEP و پروتئین های دخیل در تمایز به سمت عصب ۵۹

شکل ۲-۶- نمای کلی از پروتوکل عصب زایی تا مرحله [۲+/۲+/۲-].....۶۲

شکل ۲-۷- پروتوکل نحوه آماده سازی فراکسیون های فاقد هسته از سلول تمایز یافته RB١ جهت تسهیل آنالیز برهم کنش های پروتئین های غیر هسته ای با PEP.....۶۳

شکل ۳-۱- ساختار های بیوانفورماتیکی طراحی شده برای پروتئین پراکسی زومی (PEP) ۶۵

شکل ۳-۲- بررسی کارایی سلول های کارا به بیان ژن، BL٢١ از سویه ی JM١٠٣ .....۶۶

شکل ۳-۳- بررسی آلودگی یا عدم آلودگی سلول های کارا تولید شده.....۶۷

شکل ۳-۴- بررسی تأثیر تغییر دما در میزان بیان پروتئین نوترکیب GST-PEP ۶۸

شکل ۳-۵- بررسی تأثیر تغییر غلظت IPTGدر میزان بیان پروتئین نوترکیب GST-PEP ۶۹

شکل ۳-۶- بررسی تأثیر تغییر نوع شوینده در میزان جداسازی پروتئین نوترکیب.....۷۰

شکل ۳-۷- تخلیص پروتئین نوترکیب GST-PEPو بررسی آن با رنگ آمیزی نیترات نقره و کوماسی بلو ۷۱

شکل ۳-۸- بررسی میزان بیان و میزان تخلیص پروتئین نوترکیب GST-PEPاز طریق آنالیز وسترن بلات ۷۲

شکل ۳-۹- تصویر گرفته شده از طریق لنز عدسی میکروسکوپ لوپ از اجسام شبه جنینی در مرحله

عنوان **صفحه**

[۲-] ۷۳
شکل ۳-۱۰- آنالیز پروتئین های دارای برهمکنش با پروتئین پراکسی زومی PEP ۷۴
شکل ۴-۱- نمای شماتیک مراحل کلی ساخت وکتور pGEX٦p٢/PEP قطعه PEP-cDNA با استفاده از واکنش PCR ۷۷
شکل ۴-۲- نقشه وکتور بیانی پروکاریوتی pGEX٦p٢/PEP ۷۹

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کشف پراکسی زوم

پراکسی زوم ها، اندامک های یوکاریوتی تک‌غشائی هستند که دارای عملکردهای متنوع می‌باشند. این اندامک ها مکانیسم‌های بیوژنتیکی مشابهی دارند و در بدو امر (۱۹۵۴) از طریق مورفولوژیک تشخیص داده شدند و سپس (در سال ۱۹۶۵) عملکرد آنها مورد بررسی واقع گردید. در سال ۱۹۵۴، Johannes Rhodin، در سلول های کلیه موش، ارگانلهای کوچکی در حد ۰.۵ میکرومتر شناسایی و آنها را میکروبادی نامید. در سال ۱۹۶۵، Christian de Duve فعالیت پراکسیداسیونی این میکروبادی ها را شناسایی کرد و نام پراکسی زوم را برای ساختارهای فوق پیشنهاد کرد (Knoll *et al.* ۱۹۹۹; Singh *et al.* ۲۰۰۰).

این ارگانل ها از جمله اندامک های تک غشایی تمام سلول های یوکاریوتی، بجز آرکوزوآها هستند. معمولاً پراکسی زوم ها حاوی ماتریکسی هستند که درون آن پروتئین های محلول در آب وجود دارد. پراکسی زوم ها دارای آنزیم های متنوعی هستند که این آنزیم ها شامل کاتالاز، آنزیم های دخیل در β اکسیداسیون اسیدهای چرب بسیار طویل، همچنین آنزیم هایی که در سنتز پلاسمالوژن ها نقش دارند، می‌باشند. پراکسی زوم ها درمراحل مختلف اکسیداسیون اسیدهای آمینه D و L، اسیداوریک، الکلها، پلی‌آمین، α هیدروکسی‌اسیدها، دی‌کربوکسیلیک اسیدها و پیپکولیک اسیدها، گلی‌اکسی لات و پروستاگلاندین‌ها همچنین در بیوسنتز کلسترول،

گلیسرولیپیدها و اسیدهای صفراوی نقش دارند (Knoll *et al.* ۱۹۹۹; Singh *et al.* ۲۰۰۰; Suzuki *et al.* ۲۰۰۱; Ishikawa *et al.* ۲۰۰۱; Knoll *et al.* ۲۰۰۰).

۱-۲ عملکرد پراکسی زوم

پراکسی زوم ها در تولید پراکسید و سمیت زدایی آن نقش دارند و همچنین نقش اصلی را در اکسیداسیون اسیدهای چرب ایفاء می‌کنند. این اندامک ها در بعضی سلول ها و موجودات، عملکردهای ویژه‌ای دارند. برخی از فعالیت‌های پراکسی زومی عبارتند از:

۱. پراکسی زوم ها، براساس پراکسید هیدروژن تنفس انجام می‌دهند:

فلاوین اکسیدازها، سبب احیاء اکسیژن به پراکسید هیدروژن می‌شوند که سپس توسط کاتالاز تجزیه می‌گردد. اکسیدازها به منظور حذف هیدروژن از سوبستراهای آلی ویژه، از مولکول اکسیژن استفاده می‌کنند. ترکیبات مختلفی مثل اسیدهای آمینهL و D، پلی‌آمین‌ها، متانول، اورات، گزانتین و اسیدهای چرب با زنجیره بسیار بلند، به عنوان سوبستراهای مختلفی برای اکسیدازها به کار می‌روند. سیستم کاتالاز-فلاوین اکسیداز، ۲۰٪ اکسیژن مصرفی بافت های کبدی را شامل می‌شود. بنابراین، پراکسی زوم ها در تنظیم فشار اکسیژن سلول، ممکن است مهم باشند.

۲. پراکسی زوم ها در اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش دارند:

اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری رخ می‌دهد. اما اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره (زنجیرهای دارای بیش از ۲۴کربن) به طور مؤثری توسط میتوکندری انجام نمی‌گیرد. از آنجایی که پراکسی زوم دارای آنزیم های بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب است قسمت اعظم اسیدهای چرب بلند زنجیره در پراکسی زوم ها اکسید می‌شود.

۳. در حیوانات، علاوه بر تجزیه لیپیدها، پروکسی‌زومها درسنتز برخی لیپیدها مثل پلاسمالوژن، کلسترول و اسیدهای صفراوی نیز نقش دارند (Furuki *et al.* ۲۰۰٦; Sheikh et al. ۱۹۹۸; Shimizu *et al.* ۱۹۹۹; Singha *et al.* ۲۰۰٤).

پراکسی زوم ها خانواده‌ای از اندامک ها می‌باشند که مکانیسم پیدایش مشترکی دارند و عملکرد آنها بسته به بافت، مرحله رشد و شرایط محیطی متفاوت است. انواع مختلف پراکسی زوم ها می‌توانند در اثر سنتز و ورود آنزیم های جدید به هم تبدیل شوند. برخی فعالیتها نظیر، بتااکسیداسیون اسیدهای چرب و متابولیسم گونه‌های

واکنش گر اکسیژن[۱] در همه انواع پراکسی زوم مشترک است، اما سایر فعالیتها نظیر، تنفس نوری که در پراکسی زوم های برگهای گیاهان C^{3} رخ می‌دهد و متابولیسم آلکانها و متانول که در پراکسی زوم های برخی قارچ ها رخ می‌دهد، اختصاصی‌اند. گیاهان و قارچ ها دارای انواع تخصص‌یافته پراکسی زوم به نام گلی‌اکسیزوم هستند که سیکل گلی‌اکسی لات در آن انجام می‌شود، از این رو آنها قادرند اجزاء دو کربنه را برای گلوکونئوژنز بکار ببرند. تریپانوزوم‌ها دارای اندامک های شبه پراکسی زومی به نام گلی‌کوزوم‌اند که محتوی بسیاری از آنزیم های گلیکولیز می‌باشند. در پستانداران، پراکسی زوم ها در بیوسنتز لیپیدهای متصل به اتر و تخریب دی‌کربوکسیلیک‌های بلند زنجیره و ذخیره‌سازی اسیدهای چربی که برای مرحله نهایی تخریب به میتوکندری صادر می‌شوند، نقش اساسی دارند. بیش از ۸۰ آنزیم پراکسی زومی مختلف شناخته شده ولی بیشتر آنها هنوز کشف نشده‌اند(Baker *et al.* ۲۰۰۰). کاتالاز یکی از آنزیم های مهم پراکسی زومی است که به دلیل اینکه بیشترین مقدار آنزیم را در داخل پراکسی زوم دارا می‌باشد به عنوان مارکر پراکسی زومی محسوب می‌شود. در سال ۱۹۶۸، Alex Novikoff و Sidney Goldfisher با استفاده از رنگ آمیزی دی‌آمینو بنزیدین و میکروسکوپ الکترونی به بررسی کاتالاز پرداختند (Novikoff and Goldfisher ۱۹۶۹).

۱-۳ ساختمان پراکسی زوم

پراکسی زوم ها اندامک های کروی شکل داخل سلولی، به قطر۱-۰.۱ میکرومترمی باشند که یک غشاء تک لایه آنها را پوشانیده است و درتمام سلول های یوکاریوتی، ازمخمر تا انسان، وجود دارند(Ferrer *et al.* ۲۰۰۵).

۱. پروکسی زوم دارای چندین پروتئین غشایی ویژه است:

- PMP۷۰ پروتئین غشایی متعلق به خانواده بزرگ پروتئین های انتقالی به نام ATP- Cassette Binding یا (ABC) می‌باشد.
- تعدادی از پروتئین های فوق‌الذکر در انتقال مولکولهای مختلفی که از نظر اندازه و بار الکتریکی با هم تفاوت دارند، نقش دارند.
- پروتئین های مذکور، همچنین دارای نواحی انتهایی با اسید آمینه‌های هیدروفوبیک و شش قطعه پیچ خورده در غشاء هستند که با نواحی هیدروفیلیک حاوی ATP همراه است.

۲. بیشترین و مهمترین آنزیم پراکسی زومی، کاتالاز است:

---

۱. Reactive oxygen species

- در حدود ۴۰٪ کل پروتئین های پراکسی زوم را کاتالاز تشکیل می‌دهد.
- کاتالاز فعال یک تترامر حاوی هِم است.
- کاتالاز به منظور اکسیداسیون سوبستراهایی مثل اتانول از پراکسید هیدروژن استفاده می‌کند.
- کاتالاز، همچنین، مقادیر اضافی پراکسیدهیدروژن را نیز تجزیه می‌کند.

۳. گروه دیگر آنزیم های پراکسی زومی، اکسیدازها هستند:

- اکسیدازهای پراکسی زومی، اکسیدازهای فلاوینی نامیده می‌شوند زیرا برای فعالیت از فلاوین به عنوان کوآنزیم بهره می‌برند.
- مثال های ویژه در این رابطه، اورات اکسیدازها، D آمینو اسیداکسیدازها و L آمینو اسید اکسیدازها و آسیل کوآکسیداز می‌باشند.
- این اکسیدازها، سوبستراهای خود را اکسید کرده و اکسیژن را به پراکسید هیدروژن احیاء می‌کنند.

۴. همراه با فعالیت اکسیدازهای فلاوینی و کاتالاز، پراکسی زوم ها در متابولیسم پراکسید هیدروژن نیز دخالت دارند.

۵. بیش از ۴۰ آنزیم مختلف در پراکسی زوم ها جای گرفته است:

- این آنزیم ها مسئول انجام واکنشهای کاتابولیک و آنابولیک مختلفی هستند.
- یک مثال مهم در این رابطه، آنزیم های درگیر در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب است.

۴-۱ انتقال انواع پروتئین ها به پراکسی زوم

در مقایسه با مکانیسم ورود پروتئین های ماتریکس پراکسی زوم، اطلاعات اندکی درمورد ورود پروتئین های غشای پراکسی زومی موجود است. همانند پروتئین های ماتریکس، بیشتر PMP[۱] ها پس از سنتز شدن برروی ریبوزومهای آزاد و انجام مراحل پس از ترجمه، از سیتوزول به سمت غشای پراکسی زوم روانه می‌گردند. به نظرنمی‌رسد که ورود PMP ها نیاز به هیدرولیز ATP داشته باشد. بیشتر مطالعات نشان می‌دهد که مکانیسم ورود PMP ها از ورود پروتئین های ماتریکس مجزا می‌باشد. تحقیقات زیادی در مورد توالی هدف‌یابی PMPها انجام شده و مشخص شده است که یک توالی خاصی تحت عنوان mPTS[۲] وجود دارد.

---

۱. Peroxisomal Membrane Proteins
۲. Membrane-Peroxisomal Targeting Signal

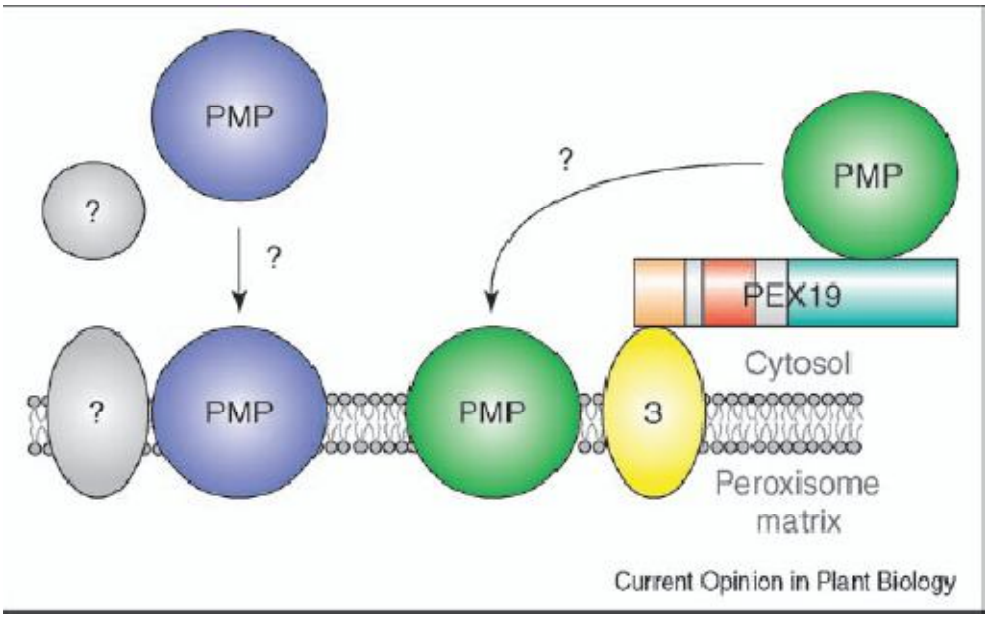
۱-۵ مکانیسم ورود پروتئین های غشای پراکسی زومی

با توجه به آزمایشات و مطالعات انجام شده انتظار می‌رود که جهش در ژن های پراکسین که در ورود PMP ها نقش دارند، باعث تهی شدن غشا از این پروتئین ها شده و در نتیجه تمام غشای پراکسی زومی فرو پاشیده می-گردد.

Pex۱۹p، Pex۱٦p، Pex۳p برای تجمع و تشکیل غشای پراکسی زومی نقش عمده دارند، به طوریکه هنوز عقیده بر آن است که این سه پروتئین کلید اصلی بیوژنز غشای پراکسی زومی محسوب می‌شوند. Pex۱۹p عمدتاً یک پروتئین سیتوزولیک است، اگر چه به صورت موقتی نیز با غشای پراکسی زومی باند می‌شود. Pex۱۹p با بخش سیتوزولی Pex۳p میانکنش می‌دهد. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که Pex۱۹p به عنوان یک گیرندهٔ ورود[۱] عمل می‌کند، PMP های جدید را شناسایی کرده، به PMP ها در سمت سیتوزول متصل شده و با کمک Pex۳p در قرارگیری PMP ها در غشای پراکسی زومی عمل می‌کند. از سویی دیگر علاوه بر نقش گیرنده‌ای Pex۱۹p، عنوان شده است که Pex۱۹p عملکرد شبه چاپرونی در غشای پراکسی زوم دارد. البته در این مورد هنوز جای بحث و شک وجود دارد (Brown and Baker ۲۰۰۳).

Pex۳p یکی از پروتئین های غشای پراکسی زومی است که با Pex۱۹p در غشای این اندامک میانکنش می-دهد. انتهای آمینی Pex۳p در لنگرانداختن آن درغشای پراکسی زوم نقش دارد. انتهای کربوکسیل آن در اتصال با Pex۱۹p مهم و ضروری می‌باشد. تصور بر این است که Pex۱۹p پروتئین های غشایی تازه سنتز شده را در سیتوزول شناسایی کرده و مستقیماً آنها را از طریق اتصال به Pex۳p به سمت غشا هدایت می کند (Brown and Baker ۲۰۰۳; Heiland and Erdmann ۲۰۰۵)(شکل۱-۱).

۱. Import Receptor



شکل ۱- ۱: ورود پروتئین های غشاء پراکسی زومی: PEX۱۹ دارای سه زنجیره است که زنجیره انتهای آمینی آن به pex۳p و زنجیره انتهای کربوکسیلی آن به mPTS یک PMP معین متصل می‌شود.

(Baker and Sparkes ۲۰۰۵)

اما در سلول های پستانداران علاوه بر دو پروتئین مذکور Pex۱۶p نیز در ورود PMP ها مهم می‌باشد (Brown and Baker ۲۰۰۳; Baker and Sparkes ۲۰۰۵; Heiland and Erdmann ۲۰۰۵).
اگر چه هنوز نقش اصلی Pex۱۶p در ورود PMP ها مشخص نیست اما پیشنهاد شده است که Pex۱۶p درمراحل اولیه تجمع غشای پراکسی زومی در فرادست Pex۳p و Pex۱۹p عمل می‌کند زیرا که در سلول های انسانی که نقص در Pex۱۶p دارند هیچ اثری از پراکسی زوم دیده نمی‌شود
(Brown and Baker ۲۰۰۳).

۱-۶ ورود پروتئین ها به ماتریکس پراکسی زوم

ورود پروتئین ها به پراکسی زوم فرآیندی چند مرحله‌ایست که به طور خلاصه عبارت است از: شناسایی پروتئین پراکسی زومی توسط گیرنده که در سیتوزول صورت می‌گیرد، اتصال کمپلکس گیرنده-پروتئین به غشاء پراکسی زوم، انتقال از عرض غشاء پراکسی زوم، آزاد شدن پروتئین در اندامک و بازگشت گیرنده به سیتوزول.

هدف‌یابی صحیح پروتئین های ماتریکس پراکسی زوم، از طریق توالی‌های موجود در ساختار اولیه این پروتئین ها صورت می‌گیرد که سیگنال هدف‌یابی پراکسی زومی[۱] (PTS) نامیده می‌شود. بسیاری از پروتئین های ماتریکس دارای سیگنال هدف‌یابی پراکسی زومی نوع یک PTS۱ می‌باشند که شامل تری‌پپتید Ser-Lys-Leu-COOH و یا یک نوع حفاظت شده از آن در انتهای کربوکسیل پروتئین می‌باشد. از جمله این پروتئین ها می‌توان به PEP (پروتئین پراکسی زومی[۲]) اشاره کرد که به نظر می‌رسد این پروتئین در روند تکوین ماهیچه و مغز جنین موش نقش دارد.

تعداد کمی از پروتئین های ماتریکس پراکسی زوم، از طریق سیگنال متفاوتی به نام سیگنال هدف‌یابی پراکسی زومی نوع دو (PTS۲) وارد این اندامک می‌شوند. PTS۲ شامل یک توالی ۹ اسید آمینه است که نزدیک به انتهای آمینی پروتئین قرار گرفته است.

به طور کلی پذیرفته شده است که پروتئین های Pex۵p و Pex۷p گیرنده‌های مربوط به سیگنال هدف‌یابی پراکسی زومی‌اند. این گیرنده‌ها بین سیتوزول و پراکسی زوم در گردش‌اند و این ویژگی سبب شده که به این روند، مدل رفت و برگشتی[۳] گفته شود. بر اساس این مدل، گیرنده‌ها در سیتوزول به پروتئین های حامل سیگنال پراکسی زومی متصل می‌شوند و آنها را به کمپلکس لنگرگاهی[۴] در غشاء پراکسی زوم منتقل می‌کنند. در این قسمت پروتئین پراکسی زومی رها می‌شود و در عرض غشاء پراکسی زوم جابه‌جا می‌شود و گیرنده[۵] به روشی که تا کنون شناخته نشده است به سیتوزول برمی‌گردند. علاوه بر مدل فوق، فرضیه رفت و برگشتی ممتد[۶] هم برای ورود پروتئین ها به ماتریکس مطرح است که بر اساس این فرضیه، گیرنده در غشاء پراکسی زوم متوقف نمی‌شود و همراه بار خود وارد لومن پراکسی زوم می‌شود، سپس پروتئین درون ماتریکس پراکسی زوم آزاد می‌شود و گیرنده به سیتوزول برمی‌گردد (Baker and Sparkes ۲۰۰۵) (شکل۱-۲).

---

۱. Peroxisomal Targeting Signal
۲. Peroxisomal Protein
۳. Shuttle model
٤. Docking and translocation complex
٥. Receptor shuttles
٦. Extended shuttle