**دانشکده :زیست شناسی**

**پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی گرایش: ژنتیک**

**عنوان پایان نامه:**

# بررسی بیوانفورماتیکی و تجربی امکان وجود miRNA اینترونی در ژن P75NTR انسانی

**نام دانشجو:**

**سپیده پارسی**

استاد راهنما:

دکتر بهرام محمد سلطانی

استاد مشاور:

دکتر سید جواد مولی

اردیبهشت 90

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به **پدر و مادر عزیزم** تقدیم می کنم

## با تشکر و قدردانی از :

کلیه عزیزانی که بنده را در طول دوران تحصیل یاری نموده و لطف و مرحمتشان را همیشه نسبت به بنده ارزانی داشته اند. عزیزانی که بدون شک راهنمایی هایشان عامل اصلی رسیدن من به این نقطه از زندگی بوده است.

استاد عزیز و گرامی جناب آقای **دکتر بهرام سلطانی** که با مساعدت همیشگی و راهنمایی های بیدریغ شان مرا در تمام مدت تحصیلم یاری نمودند.

استاد عزیز و گرامی جناب آقای **دکتر سید جواد مولی** که از مشاورت های ارزنده و مساعدت همیشگی ایشان در طول انجام پایان نامه برخوردار بودم.

اساتید بزرگوار جناب آقای **دکتر مجید صادقی زاده و** جناب آقای **دکتر مهرداد بهمنش** که در تمام مدت تحصیل در این دانشگاه همواره از راهنمایی ها و مساعدت ایشان استفاده نموده ام.

تمامی دوستان و همکارانی که صمیمانه مرا در طول انجام این پایان نامه یاری رساندند.

## چکیده

نروتروفین ها دامنه وسیعی از فعالیت ها را در سلول نشان میدهند. P75NTR، یکی از گیرنده های مهم نوروتروفین هاست که مسیر سیگنالینگ آن بدرستی مشخص نیست. این ژن هم به عنوان تومورساپرسور و هم افزایش دهنده متاستاز در بدخیمی ها معرفی شده است. گر چه دخالت برخی miRNAها در سرطانها معلوم شده است ولی دخالت miRNA ها در این مسیر بخصوص که از p75NTR میگذرد مشخص نیست. در این تحقیق با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی و روش های تجربی موفق شدیم حضور یک miRNA را در اینترون چهارم این ژن را نشان داده و افزایش تولید این miRNA را بعد از انتقال پیش ساز مربوطه به سلولهای Hela نشان دهیم. ژن P75 برای مدت زمان کوتاهی در سلولهای خاص بیان دارد ولی بیان ان در سلولهای گلیومایی طولانی تر است. در این تحقیق بیان این miRNA در سلولهای سرطانی گلیومایی به همراه بیان ژن P75 نیز نشان داده شد که احتمالا بیانگر اشتراک پراموتر انهاست.همچنین به صورت بیوانفورماتیکی نیز ارتباط عملکردی p75 و mir اینترونی آن نشان داده شد. حضور یک miRNA اینترونی که تحت پروموتر P75 کد میشود پیچیدگی مسیر سیگنالینگ P75 را افزایش میدهد ولی میتواند یکی از عوامل دخیل در رفتار دوگانه P75 قلمداد شود. از آنجاییکه P75 در نقاط حساسی از نمو سلولهای عصبی بیان میشود، حفظ چنین miRNA ای در یک اینترون نسبتا کوتاه بیانگر نقش احتمالا مهم ان در تکامل سیستم عصبی پستانداران است.



**واژگان کلیدی**: P75NTR ،miRNA ، روش های بیوانفورماتیکی شناسایی miRNA

# فهرست مطالب


عنوان .....صفحه
فصل ۱ ..... ۱
۱-۱- مروری بر مسیر سیگنالینگ نوروتروفین ها ..... ۲
۱-۲- گیرنده فاکتور رشد عصبی با تمایل پایین(P75NTR) ..... ۲
۱-۳- ساختار ژن P75NTR ..... ۳
۱-۴- ساختار پروتئین P75NTR ..... ۴
۱-۴-۱- لیگاند های متصل شونده به P75NTR ..... ۵
1-4-2- به کارگیری ملکول های آداپتور توسط P75NTR ..... ۷
۱-۵- مسیر سیگنالینگ P75NTR درالقای حیات و آپوپتوز سلول ها ..... ۹
۱-۶- دخالت P75NTR در سرطان ..... ۱۲
- P75NTR و نقش آن در پیشرفت سرطان ..... ۱۴
۱-۷- نقش P75NTR در بیماری های انسانی غیر از سرطان ..... ۱۶
۱-۸- عوامل شناخته شده تنظیمی P75NTR ..... ۱۷
۱-۹- بخش دوم: مروری بر miRNA و روش های شناسایی از دید تجربی و بیوانفورماتیکی ..... ۱۸
۱-۹-۱-miRNA ساختار و بیوژنز ..... ۱۸
۱-۹-۲- بیوژنز miRNA ی اینترونی ..... ۲۲
۱-۹-۳- روش های بیوانفورماتیکی شناسایی miRNAهای جدید ..... ۲۴
۱-۹-۳-۱- رویکردهای بر مبنای حفظ شدگی توالی miRNAها ..... ۲۵
۱-۹-۳-۲- رویکردهای بر پایه یادگیری ماشین ..... ۲۵
۱-۹-۴- روش های تجربی شناسایی miRNA ..... ۲۷
۱-۹-۵- روش های بیوانفورماتیکی شناسایی اهداف یک miRNA ..... ۲۹
۱-۹-۵-۱-TargetScan وTargetScanS ..... ۳۱
۱-۹-۵-۲-PicTar ..... ۳۲
۱-۹-۵-۳-miRanda ..... ۳۲
۱-۹-۵-۴-DIANA-microT ..... ۳۳
۱-۹-۶- روش های تجربی شناسایی اهداف miRNA و پیشرفت های حاصله ..... ۳۳
۱-۱۰- شکل گیری ایده و اهداف تحقیق ..... ۳۵
فصل ۲ ..... ۳۶
2-1- مطالعات بیوانفورماتیکی ..... ۳۷
۲-۱-۱- بررسی توالی ژن P75 برای یافتن نواحی دارای پتانسیل برای کد کردن mir ..... ۳۷
۲-۱-۲- بررسی وجود پروموتر مستقل در بالادست miRNA یافت شده ..... ۳۹
۲-۱-۳- بررسی بیوانفورماتیکی اهداف ژنی mir ..... ۳۹

۲-۱-۳-۱- بررسی بیوانفورماتیکی ارتباط ژن میزبان P75NTR و mir اینترونی کد شده ..... ۴۰
۲-۲- مطالعات تجربی ..... ۴۰
۲-۲-۱- استخراج DNA ژنومیک انسانی از خون ..... ۴۰
۲-۲-۱-۱- مواد و وسایل لازم برای استخراج DNA ..... ۴۰
۲-۲-۱-۲- آماده سازی بافرهای لازم ..... ۴۰
۲-۲-۱-۳- مراحل کار: ..... ۴۲
۲-۲-۲- تکثیر ناحیه ای از اینترون 4 ژن P75NTR ..... ۴۳
۲-۲-۲-۱- طراحی پرایمر ..... ۴۳
۲-۲-۲-۲- آماده سازی پرایمرهایPCR ..... ۴۴
**Gene and primer name** ..... ۴۴
Sequence 5’ to 3’ ..... ۴۴
۲-۲-۳- بهینه کردن PCR برای تکثیر قطعات غنی از GC ..... ۴۵
2-2-3-1- مواد و وسایل لازم ..... ۴۵
۲-۲-۴- استخراج از ژل اگارز و تخلیص محصول PCR ..... ۴۵
۲-۲-۴-۱- مراحل کار ..... ۴۵
۲-۲-۵- کلونینگ ناحیه اینترونی درTA vector ..... ۴۶
2-2-5-1- مواد و وسایل لازم ..... ۴۶
۲-۲-۵-۲- کشت باکتری DH5a ..... ۴۸
۲-۲-۵-۳- مستعد کردن باکتری a5DH با استفاده از کلرید کلسیم ..... ۴۸
۲-۲-۵-۴- مواد و وسایل لازم ..... ۴۸
۲-۲-۵-۵- مراحل تهیه باکتری مستعد ..... ۴۹
۲-۲-۶- استخراج پلاسمید در مقیاس کم ..... ۴۹
۲-۲-۶-۱- تهیه محلول های لازم ..... ۴۹
2-2-6-2- مراحل استخراج پلاسمید با روش Miniprep ..... ۵۱
۲-۲-۶-۳- تایید پلاسمید استخراج شده با پرایمر های داخلی nested ..... ۵۳
۲-۲-۷- کلونینگ ناحیه پیش بینی شده به عنوان پیش ساز microRNA ..... ۵۳
۲-۲-۸- تکثیر و استخراج وکتور بیانی سلول یوکاریوت ..... ۵۴
۲-۲-۸-۱- تایید پلاسمید استخراجی با روش هضم آنزیمی ..... ۵۶
۲-۲-۸-۱-۱- مواد و وسایل لازم ..... ۵۶
۲-۲-۸-۲- غربال گری کلون های نوترکیب باکتریایی با کلونی PCR ..... ۵۶
۲-۲-۸-۳- تعیین توالی وکتور نهایی ..... ۵۷
۲-۲-۹- کشت سلول های Daoy- 1321N1 -A172 -U87- Hela ..... ۵۷
۲-۲-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ..... ۵۷
۲-۲-۱۰- پاساژ ..... ۵۸
2-2-10-1- مواد و وسائل لازم ..... ۵۸
..... ۵۸

۲-۲-۱۰-۲- روش کار ..... ۵۸
۲-۲-۱۱- انجماد سلول ها ..... ۵۹
۲-۲-۱۱-۱- مواد و وسائل لازم ..... ۵۹
۲-۲-۱۱-۲- روش کار ..... ۵۹
۲-۲-۱۲- ترانسفکت سلول های Hela با پلاسمید حاوی پیش ساز p75-mir با استفاده از لیپوفکتامین ..... ۶۰
2-2-12-1- مراحل کار ..... ۶۱
۲-۲-۱۳- عکس برداری فلورسانت از سلول ها ..... ۶۲
..... ۶۲
۲-۲-۱۴- استخراج RNA کل از سلول ها ..... ۶۲
۲-۲-۱۴-۱- مواد و وسایل لازم جهت استخراج RNA کل ..... ۶۲
2-2-14-2- روش تهیه آب تیمار شده با DEPC ..... ۶۲
2-2-15- بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده ..... ۶۴
۲-۲-۱۵-۱- نانودراپ ..... ۶۴
۲-۲-۱۵-۲- الکتروفورز ژل آگارز ..... ۶۴
2-2-15-2-1- الکتروفورز افقی: ..... ۶۴
مواد و وسایل لازم: ..... ۶۴
روش تهیه محلولها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز: ..... ۶۵
محلول EDTA (pH=8 و 0/5M) ..... ۶۵
مواد و وسائل لازم: ..... ۶۵
۲-۲-۱۵-۲-۲- روش انجام الکتروفورز ژل آگارز ..... ۶۶
عکسبرداری از ژل آگارز ..... ۶۷
۲-۲-۱۶- الکتروفورز عمودی ..... ۶۷
2-2-16-1- مواد و وسایل لازم ..... ۶۷
۲-۲-۱۷- افزودن دنباله poly A به مجموعه RNA استخراج شده ..... ۶۸
۲-۲-۱۸- سنتز cDNA ..... ۶۹
۲-۲-۱۸-۱- مواد و وسایل مورد نیاز: ..... ۶۹
۲-۲-۱۸-۲- مراحل کار: ..... ۶۹
۲-۲-۱۹-qPCR ..... ۷۰
۲-۲-۱۹-۱- مواد و وسایل لازم: ..... ۷۰
۲-۲-۱۹-۲- مراحل انجام کار: ..... ۷۰
۲-۲-۲۰- آنالیز مرگ سلولی با تکنیک فلوسایتومتری ..... ۷۱
۲-۲-۲۰-۱- مواد و وسائل لازم ..... ۷۱
۲-۲-۲۰-۲- مراحل ..... ۷۱
۲-۲-۲۱- آنالیز سلولهای رنگآمیزی شده با کمک دستگاه فلوسیتومتری ..... ۷۲
فصل ۳ ..... ۷۴

۳-۱- بخش اول: بررسی بیوانفورماتیکی وجود miRNAها در ژن P75NTR ..... ۷۵
۳-۱-۱- بررسی حفظ شدگی p75 int4-premir در ارگانیسم های مختلف ..... ۷۸
۳-۱-۲- بررسی ساختار های ثانویه P75int4 pre-mir ..... ۸۰
۳-۱-۳- بررسی میزان همولوژی P75 pint4re-mir با سایر پیش سازهای miRNA ها ..... ۸۰
3-2- بررسی تجربی بیان P75int4 -mir و پیش ساز آن ..... ۸۱
۳-۲-۱- تکثیر ناحیه اینترونی از ژن P75 و کلون کردن آن در TA وکتور ..... ۸۱
۳-۲-۲- تایید صحت قطعه کلون شده در TA vector با پرایمر های nested ..... ۸۲
۳-۲-۳- کلون کردن ناحیه p75 int4-premir در وکتور بیانی یوکاریوت ..... ۸۳
۳-۲-۴- تعیین توالی وکتور حامل p75 int4-premir ..... ۸۴
۳-۲-۵- بررسی بیان p75 int4 premir در سلولهای U87 به روش real time ..... ۸۵
3-2-6- بررسی بیش بیان p75 int4-premir در سلولهای ترانسفرم شده Hela ..... ۸۷
۳-۲-۷- افزایش بیان ژن های PLCXD3 و NEGR1 ..... ۹۲
3-2-8- تعیین توالی فرم بالغ miRNA کلون شده در TA vector ..... ۹۴
۳-۲-۹- هم بیانی ژنهای P75 ، P75 int4 premir و فرم بالغ ان در لاین های مغزی ..... ۹۶
فصل ۴ ..... ۹۸
۴-۱- شواهد بیوانفورماتیکی حضور یک miRNA اینترونی کد شونده در ژن P75NTR ..... ۹۹
۴-۲- بیش بیان p75int4 premir در سلولهای Hela ..... ۱۰۰
۴-۳- ارتباط عملکردی بین p75 و P75int4 mir ..... ۱۰۲
4-4- شناسایی اهداف احتمالی micro RNA ..... ۱۰۲
۴-۵- پیشنهاد مدلی برای mir اینترونی کد شونده در ژن P75 ..... ۱۰۵
۴-۶- پیشنهادات: ..... ۱۰۶
فصل ۵ ..... ۱۰۸

## فهرست شکل‌ها


شکل 1-1موقعیت کروموزومی P75NTR گرفته شده از پایگاه NCBI.....3

شکل 1-2 رونوشت های P75NTR در انسان.....3

شکل 1-3 ساختار پروتئین P75 .....4

شکل 1-4 ترکیبات متفاوت از لیگاندها در اتصال به P75NTR().....6

شکل 1-5 ویژگی رسپتورهای نوروتروفینی برای گیرنده های مختلف.....6

شکل 1-6 تنظیم مسیرBex1.....8

شکل 1-7 دخالت P75NTR در مسیرهای متنوع سیگنال دهی سلولی.....9

شکل 1-8 مسیر های سیگنال دهی فعال شده توسط فاکتور رشد عصبی.....11

شکل 1-9 دیاگرام شماتیک از پروتئین های متصل شونده به P75NTR در سلولهای شوان و الیگودندروسیت ها.....11

شکل 1-10 مسیر سیگنال دهی NGF در سلول های سرطان سینه .....15

شکل 1-11 پروموتر ژن P75 دارای عناصر تنظیمی cis میباشد که به استرس اسموزی پاسخ میدهد .18

شکل 1-12 mir های پیش بینی شده توسط targetscan که UTR ژن P75 را هدف میگیرند.....18

شکل 1-13 اعمال RNA های کوچک تنظیمی .....19

شکل 1-14 بیوژنز miRNA توضیح در متن() .....20

شکل 1-15 موقعیت کروموزومی miRNA های شناخته شده .....20

شکل 1-16 مدل بیوژنز miRNA اینترونی .....24

شکل 1-17 روش های اصلی که واکنش رونویسی معکوس از mir ها انجام میشود.....29

شکل 1-18 سه نوع اصلی دوپلکس ایجاد شده بین هدف و mRNA .....30

شکل 2-1 مراحل اصلی بیوانفورماتیکی انجام شده در این تحقیق .....37

22- .....47

شکل 2-3 نقشه پلاسمید مورد استفاده جهت بیان miRNA .....54

شکل 3-1 پیش بینی توالی پیش ساز و بالغ p75int4-mir توسط SSC profiler .....76

شکل 3-2 پیش بینی فرم پیش ساز p75int4-mir توسط برنامه mirz .....76

شکل 3-3 محل پردازش شدن فرم پیش ساز به بالغ p75int4-mir توسط آنزیم دروشا در نوکلئوتیدهای 61 و 117 نشان داده شده است. .....77

شکل 3-4 نتایج بررسی p75int4-mir توسط CID miRNA ..... 77
شکل 3-5 توالی p75-pre-mir با استفاده ازسرور mipred ..... 78
شکل 3-6 برنامه maturebayse نیز وجود توالی پیش ساز و بالغ p75int4-mir را پیش بینی کرد. 78
شکل 3-7 جستجوی blat در توالی ژنوم انسان ..... 79
شکل 3-8 ساختار ثانویه پیش بینی شده توسط RNAFOLD برایP75 pre-mir ومطابقت آن با نتایج ارائه شده در شکل 3-7 ..... 80
شکل 3-9 تکثیر بخشی از اینترون شماره 4 ژن P75 انسانی به طول1540 bp ..... 81
شکل 3-10 تایید صحت کلونینگ قطعه 1.5 kbدر TA وکتور ..... 82
شکل 3-11 تایید وکتور بیانی با واکنش هضم آنزیمی Sall ..... 83
شکل 3-12 تکثیر ناحیه پیش ساز ..... 83
شکل 3-13 تایید حضور insert در وکتور بیانی CMV با استفاده از پرایمرهای F1 و R1 ..... 84
شکل 3-14 کیفیت پلاسمید نهایی استخراج شده حامل p75int4 premir استفاده شده برای ترانسفکت سلول های Hela ..... 84
شکل 3-15 blast توالی سکانس شده p75 premir کلون شده در وکتور بیانی ..... 85
شکل 3-16 بررسی بیان p75 premir در سلولهای U87 ..... 86
شکل 3-17 نمودار melt محصولات real time تکثیر p75 premir ..... 87
شکل 3-18 بررسی فلورسانس GFP جهت کنترل کارایی ترانسفکشن (بزرگنمایی X40) ..... 88
شکل 3-19 افزایش بیان 1000 برابری فرم بالغ p75-int4 miRNA در مقایسه با سلولی که با وکتور خالی ترانسفکت شده ست ..... 90
شکل 3-20 نمودار ذوب محصولات real time سلولهای ترانسفکت شده Hela ..... 90
شکل 3-21 نمودار تکثیر محصولات real time قبل (2) و بعد (1) از ترانسفکشن سلولهای Hela ..... 91
شکل 3-22 محصولات real time بر روی ژل آکریل آمید 12 درصد ..... 91
شکل 3-23 افزایش بیان فرم پیش ساز بعد از ترانسفکشن سلولهای Hela با وکتور حاوی insert ..... 92
شکل 3-24 melt curve محصولات اختصاصی تکثیر شدهPLCXD3 و NEGR1 ..... 94
شکل 3-25 توالی یابی محصول PCR ..... 95
شکل 3-26 محل دقیق توالی بالغ miRNA روی توالی پیش ساز ..... 96
شکل 3-27 بررسی بیان NGFRو P75Int4 Mir در رده های مختلف سلولی ..... 97
شکل 4-1 هم بیانی ژن P75NTR با اهداف p75int4 mir ..... 104

## فهرست جدول‌ها

عنوان .....صفحه
جدول 1-1 الگوریتم ها وتعدادی از برنامه های مرتبط با آنها با کاربرد پیش بینی ژنهای miRNA ()..26
جدول 1-2 معرفی تعدادی از روش های پرکاربرد در miRNA detection .....28
جدول 2-1 توالی پرایمر های مورد استفاده در این تحقیق.....44
جدول 2-2 مقدار مورد نیاز برای یک واکنش ligation نسبت به اندازه insert .....47
جدول 2-3 نسبت میزان DNA /لیپوفکتامین به سطح محیط کشت .....61
جدول 3-1 بررسی کمی RNA استخراج شده از سلولهای Hela با نانودراپ .....89
جدول 3-2 غلظت RNA های لاین های سلولی مورد استفاده در realtime با استفاده از نانودراپ.....97
جدول 4-1 اهداف ژنی پیش بینی شده توسط سرور Dianamicrot.....103

# فصل ۱

# مقدمه

### ۱-۱- مروری بر مسیر سیگنالینگ نوروتروفین ها

نوروتروفین ها عوامل تروفیک دخیل در رشد و تمایز سلولهای عصبی اند. خانواده نروتروفین ها شامل اعضای فاکتور رشد عصبی شناخته شده NGF، BDNF، NT-3 وNT-4 میباشند که عملکرد های سلولی خود را از طریق گیرنده های تیروزین کینازی به نام کلی Trk ها و گیرنده p75 اعمال می کنند.عوامل متعددی در این مسیر دخالت دارند.در مورد مسیر p75 این عوامل بسته به نوع سلول و شرایط خاص آن به همراه فعالیت p75 میتوانند فعال کننده مسیر آپوپتوز یا حیات سلولی باشند.

### ۱-۲- گیرنده فاکتور رشد عصبی با تمایل پایین(P75NTR)

کشف levi و همکاران در اواخر دهه 40 سبب آغاز تحقیقات در زمینه فاکتورهای رشد گردید. آن ها برای اولین بار NGF[1] ترشح شده از بافت سارکومای موش که محرک بقای نورونی است را شناسایی کردند. و این مورد اولین گزارشی از سیگنالینگ پاراکراین بود، به این صورت که سلول های یک بافت مشخص پروتئینی را ترشح می کردند که می توانست در بافت دیگر (هدف) تغییرات سلولی پدید آورد([1]).اعضای شناخته شده این خانواده NGF، BDNF[2] 3NT و 5/4NT می باشند([2]) فاکتورهای رشد عصبی نه تنها در سیستم عصبی بلکه در بسیاری از قسمت های بدن مانند سیستم قلبی عروقی، ایمنی و سیستم های تولید مثلی بیان می شوند که به گیرنده های p75 و گیرنده های تروپومیوزین کینازTrk متصل میشوند ([3]).P75NTR اولین گیرنده ای بود که در سال 1973 برای

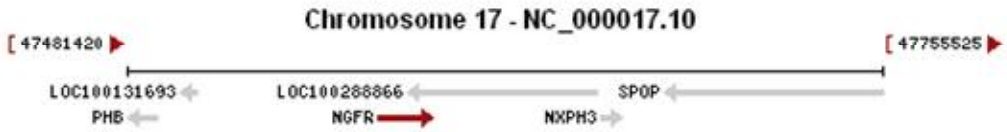
[1] nerve growth factor

[2] brain derived neurotrophic factor

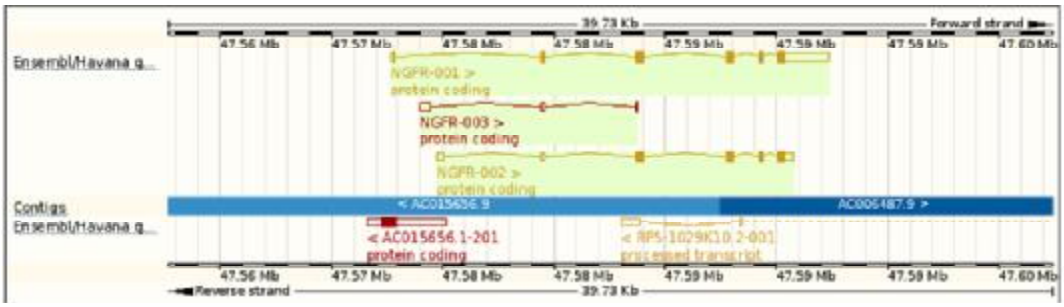
NGF شناسایی شد. این ژن متعلق به ابر خانواده TNF[1] بوده و ساختاری شبیه گیرنده p55 دارد ولی فاقد توانایی اتصال به TNF ست([4]).

### ۱-۳- ساختار ژن P75NTR

این ژن دارای 6 اگزون میباشد و در رشته مثبت کروموزوم 17 بین نوکلئوتید های -655,572,47 379,592,47 واقع شده ست . در پایگاه ensemble سه ترانسکریپت در انسان گزارش شده است که کدکننده پروتئین میباشند(**شکل**1-1).




شکل ۱-۱موقعیت کروموزومی P75NTR گرفته شده از پایگاه NCBI

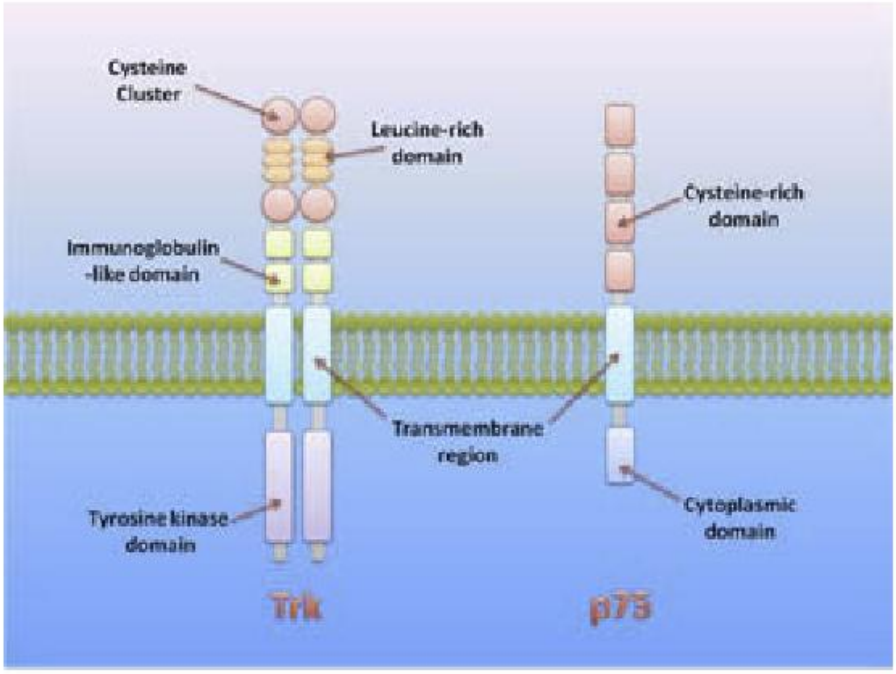



**شکل ۱-۲ رونوشت های P75NTR در انسان**

[1] tumor necrosis factor

### ۱-۴- ساختار پروتئین P75NTR

پروتئین P75NTR از نوع تراغشایی بوده با وزن ملکولی در حدود 75 کیلو دالتون که در دومین خارجی خود گلیگوزیله میباسد. P75 شانزدهمین عضو ابر خانواده TNF میباشد که دارای دومین مرگ نیز هست. لکن مکانیسم القا ی آپوپتوز از طریقP75 با سایر اعضای خانواده TNF متفاوت است.




**شکل ۱-۳ ساختار پروتئین P75**

ساختار گیرنده های p75 و تیروزین کیناز در شکل به صورت شماتیک بیان شده است. گیرنده تیروزین کیناز دارای دومین داخل سلولی تیروزین کینازی و دومین خارج سلولی دارای دومین های غنی از سیستئین و لوسین میباشد.p75 دارای چهار دومین غنی از سیستئین و یک دومین سیتوپلاسمی میباشد.

P75 شبیه سایر اعضای ابر خانواده TNF دارای چهار موتیف غنی از سیستئین، دومین تراغشایی و دومین مرگ سلولی سیتوپلاسمی ا ست **شکل**(1-3). برای اعمال اثر آپوپتوتیک باید P75NTR در فرم مونومری بوده و دایمر شدن یا هومولتی تریمر شدن ان مرگ سلولی را مهار می کند ([5]. [6]). قابل توجه است که کنفورماسیون دومین های P75 متمایز از سایر اعضای TNF بوده ([7]) و گزارشاتی که

فعالیت کاتالیتیک دومین خارج سلولی را نشان دهند اندک اند([8]) و اکثر سیگنال ها به واسطه برهم کنش دهنده های سیتوپلاسمی میانجگری می شود. خصوصیت دیگر این گیرنده آن ست که بر خلاف سایر اعضای خانواده مثل Fas /Apo ، CD 95 نیازی به دومین های FADD[1] و TRADD ندارد تا باعث القای اثر مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول های عصبی شود ([9]) .

در نورون ها P75 به همراه گیرنده های تروپومیوزین کینازی به نام TrkA بیان میشوند. این موضوع که P75 باعث مرگ سلولی نورون ها و TrkA حیات سلولی را ابقا میکند به صورت یک اصل قدیمی در علوم اعصاب مطرح بوده ولی یافته های متعددی بیان می دارند که P75 در عملکردهای متنوع سلولی بسته به نوع کورسپتور و context سلولی دخالت دارد([10] ). در سلولهای نورونی P75NTR قادراست باعث افزایش([11]-[12])یا ممانعت از رشد آکسونی[13])، و نیز کاهش([14]) یا افزایش مرگ سلولی شود([15] [16]). همچنین در سلولهای شوان سبب کاهش یا افزایش([17] [18]) مهاجرت این سلولها در طی نمو می شود. خود گیرنده P75NTR به تنهایی فاقد فعالیت کاتالیتیک است و اتصال نوروتروفین ها احتمالا با کنترل فعالیت GTPase RhoA همراه میباشد ([14]).

**۱-۴-۱- لیگاند های متصل شونده به P75NTR**

دو ناحیه از P75NTR در میان کنش پروتئین – پروتئین اهمیت بسیار اساسی دارد (13).دومین داخل سیتوپلاسمی یا chopper و دومین مرگ سلولی

فرم بالغ و پردازش شده نوروتروفین ها هر دو قادر به اتصال به با تمایل متفاوت p75 میباشند.اتصال هر کدام از گیرنده ها به p75 پیامدهای متفاوتی را به دنبال دارد برای مثال اتصال لیگاندی مانند pro-NGF که فرم نابالغ فاکتور رشد عصبی است در حضور سورتیلین به افزایش مرگ سلولی میانجامد و یا اتصال BDNF به p75 سبب القای تمایز در سلول عصبی میشود (شکل 1-4 1-5).

[1]