

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۳۱۵

۳

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

(گرایش بیوشیمی)

بررسی عملکرد و تعیین خصوصیات ساختاری آرتمین از *Artemia urmiana*
با استفاده از روش های تجربی و تئوری

از:

سیده شیرین شاهنگیان

استاد راهنما:

دکتر رضا حسن ساجدی

اساتید مشاور:

دکتر مجید تقدیر

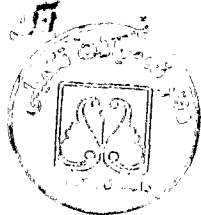
دکتر بیژن رنجبر

(شهریور ۱۳۸۸)

۱۳۸۹ / ۷ / ۳

۳

کتابخانه اطلاع رسانی مرکز علمی پژوهش



۱۴۱۵۳۲

در نهایت عشق، احترام و سپاس

تقدیم به زیباترین های آفرینش

مادرم، اقیانوس بی انتهای پاکی و صداقت

و

پدرم، دریای بیکران خوبی و محبت

تقدیم به

استاد اندیشمند، بزرگوار و بی نظیرم جناب آقای دکتر رضا حسن ساجدی که در مکتب علم و اخلاق ایشان بسیار
آموختم

و

تقدیم به تمامی عاشقان طریق دانش

بنام حضرت دوست

سپاس خداوندی را که در نهایت بزرگی به اندازه ادراک من کوچک شد، تا زمین کوچک من پایین آمد تا او را خوب بینم و بیشتر بشناسم. او را شاکرم بر تک تک روزهایی که به من هدیه کرد تا فرصت زندگی کردن، آموختن و تجربه کردن داشته باشم و در این مسیر بزرگترین نعمتهایش را به من ارزانی داشت، عزیزانی که این تجربه در کنار ایشان امکانپذیر شد و دلپذیرتر.

از استاد راهنمای فرزانه ام، جناب آقای دکتر رضا ساجدی بخاطر تمام محبت ها و راهنمایی های بیدریغ شان بی نهایت سپاسگزارم و خداوند را شاکرم که افتخار فراگیری علم و اخلاق را در محضر ایشان به من عطا نمود.

از استاد مشاور بسیار عزیزم، جناب آقای دکتر مجید تقدیر که در نهایت بزرگواری، صبر و حوصله در انجام رساله ام یاری ام رساندند صمیمانه تشکر می کنم.

از الطاف استاد مشاور ارجمندم، جناب آقای دکتر بیژن رنجبر قدردانی می کنم.

از اساتید بزرگوار و مهربانم، جناب آقای دکتر صادق حسن نیا و سرکار خانم دکتر ریحانه سریری بخاطر راهنمایی ها و زحمات بی شائبه شان سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر وزیری و سرکار خانم دکتر حسنی بخاطر قبول زحمت داوری رساله و راهنمایی های ارزنده شان کمال تشکر را دارم.

از دانشجوی بزرگوار دوره دکتری جناب آقای وهب جعفریان بخاطر کمک ها و راهنمایی های بیدریغشان در طول این دوره بی نهایت سپاسگزارم.

از زحمات اساتید گرانقدرم جناب آقای دکتر شعبانی پور، سرکار خانم دکتر صالحی، جناب آقای دکتر مشایخی، جناب آقای مهندس آقامعالی، جناب آقای دکتر سعیدی، جناب آقای دکتر نورسته نیا، جناب آقای دکتر افشار محمدیان، جناب آقای مهندس رسا و سایر اساتید محترم گروه زیست شناسی قدردانی می کنم.

از جناب آقای دکتر رضا خدارحمی، استاد دانشکده داروسازی دانشگاه کرمانشاه بخاطر تمامی کمک ها و راهنمایی های شان سپاسگزارم.

از جناب آقای پروفیسور J. S. Clegg بخاطر اهدای آنتی بادی بسیار متشکرم.

از دوست عزیزم، آقای بهنام راستی بخاطر همراهی و همکاری اش صمیمانه قدردانی می کنم.

از همکلاسی های عزیز و مهربانم بخصوص خانم نازنین پیروزی و آقای مسعود کاظمی بخاطر کمک هایشان سپاسگزارم.

از کارشناسان محترم گروه زیست شناسی، سرکار خانم ها هادوی، شایگان و امیدی تشکر می کنم.

از دوستان عزیزم بخصوص خانم ها لایلا گلعلی زاده، بیتا مصدق، سارا پیشگاه هادیان، اکرم شیردل، پریچهر زمانی، عطیه مهدوی، آمنه عباسی، سارا سیف زاده، ژیل رحیمی، زهرا حیدری، سروناز شیرزاد، الهام داسی، مریم ملاکریمی، سمیرا نصرالهی، سارا پورآقاچان و آقایان حسین غفوری، کامران خلیلی، محمدامین کریمی، مجید گلوانی، کیوان نظیفی، عبدالعلی وارسته، سایر دوستان خوبم در آزمایشگاه های تکوین، ژنتیک، زیست دریا، زیست جانوری، فیزیولوژی گیاهی، شیمی و فیزیک و نیز دوستان عزیزم در دانشگاه تربیت مدرس تشکر می کنم.

صفحه	عنوان
ح	چکیده فارسی
خ	چکیده انگلیسی
	فصل اول: مقدمه و تئوری
۲	۱-۱ آرتمیا
۳	۱-۱-۱ رده بندی جانوری
۳	۲-۱-۱ چرخه زندگی
۳	۱-۲-۱-۱ تولید مثل تخمگذار-زنده زا
۳	۲-۲-۱-۱ تولید مثل تخمگذار
۴	۳-۲-۱-۱ مراحل تکامل
۵	۳-۱-۱ راز بقای آرتمیا در شرایط استرسی
۶	۱-۳-۱-۱ استرس های محیطی
۸	۲-۱ عوامل مؤثر بر مقاومت جنین آرتمیا
۸	۱-۲-۱ پروتئین های شوک حرارتی کوچک
۸	۱-۱-۲-۱ پروتئین استرسی p26
۱۰	۱-۱-۲-۱-۱ مقایسه p26 در گونه های مختلف آرتمیا
۱۱	۲-۱-۱-۲-۱ مقایسه p26 و سایر پروتئین های α -کریستالین
۱۲	۳-۱-۱-۲-۱ عملکرد p26
۱۴	۴-۱-۱-۲-۱ مهاجرت p26
۱۵	۲-۱-۲-۱ پروتئین استرسی ArHsp21
۱۶	۱-۲-۱-۲-۱ عملکرد ArHsp21
۱۷	۲-۲-۱ پروتئین استرسی آرتمین
۲۰	۱-۲-۲-۱ عملکرد آرتمین
۲۲	۳-۲-۱ تره هالوز
۲۳	۱-۳-۲-۱ فعالیت هماهنگ تره هالوز و p26
۲۴	۴-۲-۱ پوسته سیست
۲۴	۱-۴-۲-۱ ساختار و عملکرد پوسته
۲۵	۳-۱ فریتین
۲۶	۱-۳-۱ فریتین آرتمیا
۲۷	۲-۳-۱ مقایسه آرتمین و فریتین آرتمیا
۲۷	۴-۱ اساس ساختاری تاخوردگی پروتئین

۳۰	۱-۴-۱ سدهای تاخوردگی و استفاده از چپرون ها در بهبود راندمان تاخوردگی
۳۱	۱-۱-۴-۱ چپرونهای ملکولی
۳۲	GroEL- GroES چپرونین ۱-۱-۴-۱
۳۴	۲-۱-۴-۱ مکانیسم دو مرحله ای اتصال- رهاسازی سیستم چپرونی GroEL
۳۶	۱-۱-۴-۱- α ۲- کریستالین ها
۳۷	۲-۴-۱ روش های بررسی فعالیت چپرونی
۳۷	۱-۲-۴-۱ بررسی راندمان تاخوردگی
۳۷	۲-۲-۴-۱ بررسی تجمع پروتئین
۳۹	۱-۲-۲-۴-۱ مطالعات کدورت سنجی در طول موجهای متفاوت محدوده مرئی
۴۰	۲-۲-۴-۱ پراش نور
۴۱	۵-۱ در این تحقیق
	فصل دوم: مواد و روش ها
۴۳	۱-۲- مواد، میکروارگانیسم ها و تجهیزات
۴۳	۱-۱-۲ دستگاهها
۴۳	۲-۱-۲ مواد شیمیایی
۴۴	۳-۱-۲ فیلترها و کیت ها
۴۴	۴-۱-۲ آنزیم ها، پلاسمیدها و آنتی بادی ها
۴۴	۵-۱-۲ میکروارگانیسم ها
۴۴	۲-۲ استخراج و تخلیص آرتمین از آرتمیا اورمیا
۴۶	۳-۲ سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریلامید ژل الکتروفورز
۴۶	۱-۳-۲ رنگ آمیزی کوماسی بلو
۴۷	۲-۳-۲ رنگ آمیزی نترات نقره
۴۸	۴-۲ ایمونوبلاتینگ
۴۹	۵-۲ سنجش غلظت پروتئین
۴۹	۱-۵-۲ روش لوری
۵۰	۲-۵-۲ روش بردفورد
۵۱	۳-۵-۲ اندازه گیری غلظت آنزیم کربنیک انهدراز به روش UV
۵۱	۶-۲ مطالعات دورنگ نمایی دورانی
۵۲	۷-۲ مطالعات فلوروسانس ذاتی
۵۲	۸-۲ مطالعات فلوروسانس خارجی
۵۲	۹-۲ کلونینگ ژن آرتمین در میزبان پروکاریوتی بمنظور بیان ژن آرتمین

۵۳	۱-۹-۲ هضم ژن آرتمین و ناقل
۵۴	۲-۹-۲ الکتروفورز ژل آگارز
۵۴	۳-۹-۲ استخراج محصولات هضم آنزیمی از ژل آگارز
۵۵	۴-۹-۲ جاگذاری ژن آرتمین درون حامل بیانی
۵۶	۵-۹-۲ انتقال ناقل نو ترکیب به میزبان
۵۷	۶-۹-۲ واکنش زنجیره ای پلی مرز
۵۷	۷-۹-۲ انتقال ناقل نو ترکیب به میزبان بیانی مناسب
۵۷	۸-۹-۲ استخراج پلاسمید
۵۸	۹-۹-۲ تعیین توالی نوکلئوتیدی
۵۸	۱۰-۲ بیان آرتمین
۵۹	۱۱-۲ تهیه محتوای سلولی از باکتری ها
۵۹	۱۲-۲ تخلیص پروتئین نو ترکیب
۶۰	۱۳-۲ آنالیز مقاومت حرارتی باکتری بیان کننده آرتمین (سنجش شوک حرارتی)
۶۰	۱۴-۲ بررسی فعالیت چپرونی آرتمین
۶۰	۱-۱۴-۲ تعیین فعالیت آنزیم کرینیک انهدراز
۶۱	۲-۱۴-۲ تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز تریچه کوهی
۶۲	۳-۱۴-۲ غیرطبیعی شدن CA و HRP
۶۲	۴-۱۴-۲ بررسی تجمع CA و HRP
۶۲	۵-۱۴-۲ تاخوردگی مجدد CA و HRP دناتوره
۶۳	۶-۱۴-۲ ارزیابی تاخوردگی مجدد آنزیم کرینیک انهدراز با روش فلوئوریمتری
۶۳	۱۵-۲ تعیین هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین به روش تجربی
۶۴	۱۶-۲ تعیین هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین به روش تئوری و مقایسه آن با سایر چپرون ها
۶۴	۱۷-۲ بررسی هیدروپاتی آرتمین و سایر چپرون ها
۶۴	۱۸-۲ بررسی میانکنش های قطعه انتهایی C آرتمین با سایر قسمت های پروتئین
۶۵	۱۹-۲ مقایسه توالی های آمینواسیدی آرتمین با انواع فریتین
	فصل سوم: نتایج
۶۷	۱-۳ استخراج و تخلیص آرتمین از آرتمیا اورمیانا
۶۸	۲-۳ آرتمین در شرایط احیایی و غیر احیایی
۶۹	۳-۳ مطالعات دو رنگ نمای دورانی
۷۱	۴-۳ بررسی طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در pH های مختلف
۷۱	۵-۳ بررسی طیف فلورسانس خارجی پروتئین در pH های مختلف

۷۲	۶-۳ کلونینگ ژن آرتمین در وکتور بیانی
۷۶	۷-۳ بیان پروتئین نو ترکیب
۷۷	۸-۳ ایمونوبلاتینگ
۷۸	۹-۳ تخلیص پروتئین نو ترکیب
۷۹	۱۰-۳ ارزیابی مقاومت حرارتی باکتری نو ترکیب
۸۰	۱۱-۳ اثر آرتمین نو ترکیب بر روی تاخوردگی مجدد پراکسیداز
۸۱	۱۲-۳ بررسی تأثیر آرتمین بر کیتیک پدیده تجمع کربنیک انهدراز و پراکسیداز
۸۲	۱۳-۳ اثر آرتمین بر روی تاخوردگی مجدد کربنیک انهدراز و پراکسیداز
۸۴	۱۴-۳ بررسی تاخوردگی مجدد آنزیم کربنیک انهدراز توسط نشانگر فلورسانس
۸۵	۱۵-۳ بررسی هیدروپاتی آرتمین و سایر چپرون ها
۸۷	۱۶-۳ تعیین هیدروفویسیته سطحی پروتئین به روش تجربی
۸۸	۱۷-۳ تعیین هیدروفویسیته سطحی پروتئین به روش تئوری
۸۹	۱۶-۳ بررسی موقعیت قطعه ۳۵ آمینواسیدی انتهای در آرتمین
۹۲	۱۷-۳ بررسی تفاوت عملکردی آرتمین و فریتین با استفاده از تطبیق توالی ها
	فصل چهارم: بحث
۹۶	۱-۴ استخراج، تخلیص و بررسی های ساختاری آرتمین از سیست
۹۸	۲-۴ بررسی فعالیت چپرونی آرتمین
۱۰۳	۳-۴ کلونینگ و بیان ژن آرتمین <i>آرتمیا اورمیا</i> در میزان پروکاریوتی و بررسی فعال بودن آن
۱۰۴	۴-۴ بررسی نقش انتهای آرتمین در عملکرد آن و مقایسه آرتمین با فریتین
۱۰۶	۵-۴ پیشنهادات
۱۰۷	منابع

بررسی عملکرد و تعیین خصوصیات ساختاری آرتمین از *Artemia urmiana* با استفاده از روش های تجربی و تئوری

سیده شیرین شاهنگیان

چکیده

جنین پوسته دار *آرتمیا اورمیا* مقاومت بی نظیری نسبت به استرس های شدید محیطی از خود نشان می دهد که گمان می رود بخشی از این مقاومت شگفت آور بدلیل وجود پروتئینی بنام آرتمین باشد. اطلاعات اندکی در مورد آرتمین وجود دارد. این پروتئین ۲۷ کیلو دالتونی مقاوم به حرارت ۱۲٪ از پروتئین های محلول در سلول جنینی را تشکیل می دهد و در سایر مراحل زندگی جاندار مشاهده نشده است. آرتمین از لحاظ توالی آمینواسیدی بیشترین شباهت را با فریتین دارد که پروتئین ذخیره کننده آهن می باشد. در این مطالعه ابتدا پس از تخلیص آرتمین از سیستم، خصوصیات ساختاری آن طی مطالعات اسپکتروسکوپی (CD و فلورسانس) بررسی گردید. سپس خصوصیات عملکردی آن مورد مطالعه قرار گرفت. پایداری حرارتی بالای این پروتئین امکان تخلیص آن به روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات، انکوباسیون در ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۴ دقیقه و نهایتاً کروماتوگرافی تعویض یونی را برای ما فراهم کرد. آنالیز SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیر احیایی نشان می دهد آرتمین تخلیص شده عمدتاً به صورت الیکومر می باشد. تجمع کربنیک انیدراز (CA) و پراکسیداز تریچه کوهی (HRP) غیر طبیعی شده به طریق شیمیایی در حضور و عدم حضور آرتمین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که آرتمین میزان تجمع هر دو آنزیم دنا توره را به مقدار قابل توجهی کاهش می دهد. همچنین میزان تاخوردگی مجدد آنزیم های فوق را در یک رفتار وابسته به غلظت افزایش می دهد. البته لازم به ذکر است که آرتمین به لحاظ توان چپرونی در میان تمامی چپرون های شناخته شده منحصر بفرده است. هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین نیز محاسبه گردید که مقدار آن در مقایسه با سایر چپرون ها استثنائی می باشد. سپس cDNA آرتمین درون وکتور pET28a کلون گردید و در *E. coli* دو سویه BL21 و Rosetta بنوان پروتئین نو ترکیب با دنباله هیستیدینی بیان و با روش کروماتوگرافی تمایلی با خلوص بالا تخلیص شد. پس از تأیید بیان آرتمین توسط SDS-PAGE و بلاتینگ، عملکرد پروتئین نو ترکیب نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور باکتری های ترنسفورم شده تحت شوک حرارتی در دماهای کشته قرار گرفتند. همچنین جهت بررسی فعالیت چپرونی آرتمین در *in-vitro* میزان تاخوردگی آنزیم پراکسیداز دنا توره مورد ارزیابی قرار گرفت. آرتمین بطور چشمگیری موجب ارتقاء بقای سلول های باکتری ترنسفورم شده گردید و راندمان تاخوردگی آنزیم دنا توره را نیز افزایش داد. براساس مطالعات *in-vivo* و *in-vitro* نتیجه گیری می گردد که آرتمین بعنوان یک چپرون ملکولی عمل می کند. در بخش دیگری از این تحقیق ابقای انتهای C آرتمین در مدل های قبل و بعد از بهینه سازی که در تحقیق قبلی [۴۴] بررسی شده بود، توجه گردید. مطالعه پیوندهای هیدروژنی و پلهای نمکی بین ناحیه C-terminal و سایر قسمت های پروتئین در مدل های ابتدایی و بهینه سازی شده پیشنهاد می کند که این ناحیه جایگاه خود را طی بهینه سازی نیز حفظ می کند. بعلاوه مشخص گردید که بخش C-terminal آرتمین توسط ریز محیط هیدروفوب مناسب احاطه شده است. همچنین بمنظور درک تفاوت عملکردی آرتمین و فریتین مقایسه ای بین توالی آرتمین و فریتین های L و H برخی از پستانداران انجام گرفت. نتایج حاکی از اینست که سه ناحیه حفاظت شده در فریتین ها که در میانگش با آهن دخیلند، در آرتمین تغییر یافته اند که تفاوت عملکردیشان را توجیه می کند.

کلمات کلیدی: آرتمین، چپرون، تجمع، تاخوردگی مجدد، هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین، مقاومت حرارتی، فریتین

Functional and structural investigation of artemin from *Artemia urmiana* by experimental and theoretical methods

S. Shirin Shahangian

Abstract

Encysted embryos of *Artemia urmiana* are exceptionally resistant to severe environmental stress which is thought to depend in part on the existence of a protein termed artemin. There is only little information about it. This thermostable 27kDa protein comprises about 12 % of the soluble cellular protein, but it has not been detected in other life cycle stages. According to the amino acid sequence, artemin shares highest similarity with ferritin, which is a major iron-storage protein. In the present study, after purification, structural properties were analyzed by fluorescence and CD spectroscopy. Moreover, some functional characterization of artemin from *A. urmiana* were carried out at first. Its high thermal stability allowed its purification using ammonium sulfate fractionation followed by incubation at 70°C for 14min and ion-exchange chromatography. The purified artemin was present primarily in the oligomeric form with little amount of monomer, based on reducing and nonreducing SDS-PAGE. The aggregation of chemically denatured Carbonic anhydrase (CA) and Horseradish Peroxidase (HRP) was evaluated in the presence and absence of artemin. The data indicate that artemin reduces the extent of both denatured enzyme aggregation significantly in both CA and HRP. Also, it enhances the efficiency of refolding and activity recovery of HRP and CA in a concentration- dependant manner. It's necessary to mention that the chaperoning potency of artemin is really unique among all chaperones have been studied sofar. The protein surface hydrophobicity index was calculated demonstrating exceptional value compared to other chaperones. In second round, artemin cDNA was sub-cloned in pET28a and expressed in two *E. coli* strains BL21 and Rosetta as a His-tag fusion protein and purified to homogeneity using affinity chromatography. The purified protein subsequently was confirmed by SDS-PAGE and dot blotting and the functionality of the recombinant protein was studied. For this purpose, the transformants were subjected to heat shock treatment at lethal temperatures. Also to investigate the artemin chaperoning activity *in vitro*, the refolding of chemically denatured horse radish peroxidase was monitored. Artemin significantly promoted survival of transformed bacterial cells upon exposure to thermal stress and also enhanced the efficiency of refolding and activity recovery of denatured horse radish peroxidase as well. Based on these *in vivo* and *in vitro* studies, it can be concluded that artemin acts as a molecular chaperone. In another part of this study, remaining of artemin extra C-terminal was confirmed. Our investigations showed that there are comparable numbers of H-bonds and salt bridges between the C-terminal region and other parts of artemin in both initial and refined models, suggesting that this terminal did not loose its location during the refinement process. This study also revealed that the artemin C-terminal segment is surrounded by a desirable hydrophobic microenvironment that justifies the location of the termina sequence comparative analysis between artemin and some of mammalian L and H ferritins was performed to understand their functional differences. It was concluded that three conserved regions in ferritins, cooperating in iron-interaction, have been substantially changed in artemin that can justify their functional differences.

Keywords: Artemin, Chaperone, Aggregation, Protein surface hydrophobicity, Thermotolerance, Ferritin

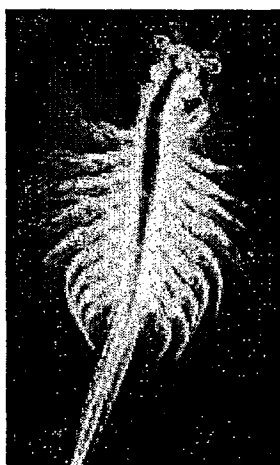
فصل اول

مقدمه

فصل اول: مقدمه و تئوری

۱-۱ آرتیمیا^۱

آرتیمیا از مقاومترین جانداران در طی تاریخ تکامل جانوران است که قادر به تحمل استرس های شدید محیطی می باشد (شکل ۱-۱). این جاندار شگفت انگیز در دریاچه های با شوری بسیار بالا، مرداب های ساحلی و حوضچه های تولید نمک یافت می شود. در بیش از ۳۰۰ ناحیه جغرافیایی در سراسر دنیا از سطح دریا تا ۴۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا، در محدوده دمایی ۴۰-۵ درجه سانتی گراد و شوری های ۷۰ تا ۲۵۰ ppm پراکنش یافته است. زندگی فعال این موجود در شرایط مذکور بیانگر توانایی تنظیم اسمزی فوق العاده و مقاومت در برابر نوسانات دمایی است. جالبتر اینکه سیست های این جانور حتی از این هم تواناتر بوده و قادرند دوزهای بسیار بالای اشعه UV، دوره های طولانی کمبود اکسیژن، گرمای بیش از حد و خشکی شدید را تحمل نمایند. این خصوصیات این موجود را بعنوان مدل منحصر بفردی جهت مطالعات بیوشیمیایی مقاومت در برابر استرس های شدید محیطی مطرح نموده است. [۸-۱]



شکل ۱-۱: آرتیمیا

۱-۱-۱ رده بندی جانوری [۹]

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

Class: Branchiopoda

Family: Artemidae

Genus: *Artemia*Species: *Parthenogenetica**Fransiscana**Persimilis**Sinica**Salina**Urmiana*

۲-۱-۱ چرخه زندگی

طی جفت گیری نرها اسپرم خود را وارد کیسه های جانبی ماده می کنند که مملو از اووسیست های بالغ می باشد. آرتمیای ماده بسته به شرایط محیطی جهت بقای خود دو مسیر تکاملی متفاوت را اتخاذ می کند [۹]:

۱-۲-۱-۱ تولید مثل تخمگذار- زنده زا^۱

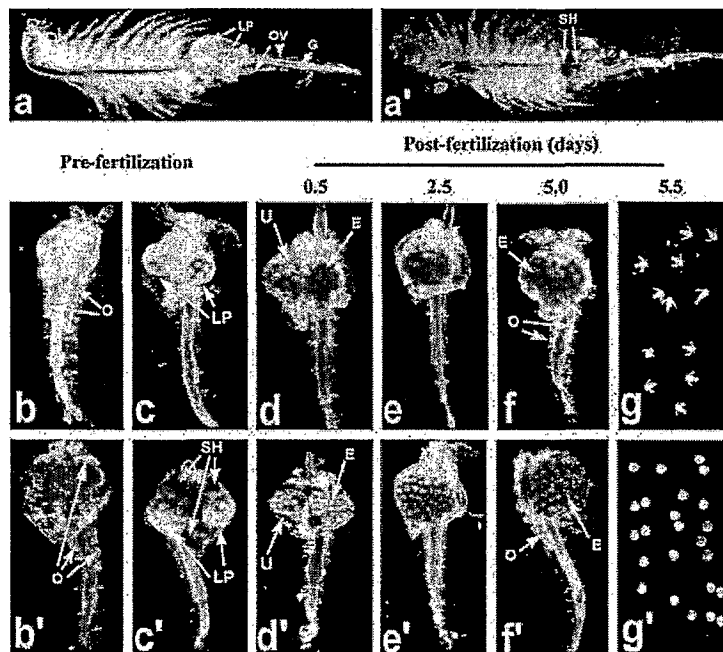
این مسیر تکاملی در شرایط مساعد محیطی بوقوع می پیوندد و توسط اووسیست های سبز رنگ و در غیاب غدد سازنده پوسته^۲ القاء می شود. اووسیست ها پس از انتقال از تخمدان به کیسه های جانبی، لقاح یافته و تخم ها در رحم تشکیل می شوند. تخم ها بلافاصله وارد مسیر تکاملی شده و مراحل مختلف جنینی را طی می نمایند و در نهایت لاروهای شناگر آزاد^۳ متولد می گردند (شکل ۱-۲-۱، b) [۱۰-۱۱]g.

۲-۲-۱-۱ تولید مثل تخمگذار^۴

این مسیر که توسط اووسیست های زرد رنگ در حضور غدد سازنده پوسته القاء می شود در شرایط سخت و در مواجهه با استرس های شدید محیطی بوقوع می پیوندد. پس از لقاح، نمو جنینی در مرحله گاسترولا متوقف می شود. در این حالت جنین توسط پوسته

-
- 1 - Ovoviviparous development
 - 2 - Shell gland
 - 3 - Nauplii
 - 4 - Oviparous development

ای ضخیم احاطه شده و در نهایت این جنین های دارای پوسته که سیست^۱ نام دارند وارد مرحله ی برنامه ریزی شده از لحاظ ژنتیکی می گردند که خفتگی برگشت پذیر است و دیاپوز^۲ نام دارد. طی دیاپوز متابولیسم به شدت کاهش می یابد. جنین های خفته نسبت به استرس های شدید فیزیولوژیک مقاومند و بمحض قرار گرفتن در شرایط مساعد محیطی (آب و اکسیژن کافی، دما و شوری مناسب) تکامل را از سر گرفته و تبدیل به لاروهای شناگر آزاد می شوند (شکل ۱-۲، g' - b') [۱۴-۱۲].



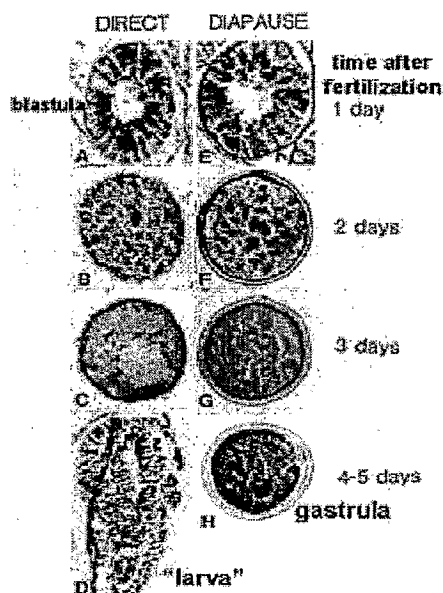
شکل ۱-۲: تکامل تخمگذار و تخمگذار-زنده زا در آرتمیا. (a', a) جاندار ماده حاوی اووسیت های بالغ در کیسه های جانبی، (b - g) مراحل تکامل تخمگذار-زنده زا از نیم روز پیش از لقاح تا رهایی لاروهای شناگر آزاد، (b' - g') مراحل تکامل تخمگذار از نیم روز پیش از لقاح تا رهایی سیست ها از ماده، E: جنین، O: اووسیت ها، LP: کیسه های جانبی، OV: تخمدان، SH: غدد سازنده پوسته، U: رحم [۱۴].

۱-۱-۲-۳ مراحل تکامل

تا مرحله گاسترولا^۳ هر دو مسیر تکاملی با سرعت یکسان پیش می روند. در هر دو مسیر ابتدا حدود ۶ ساعت بعد از لقاح کلیواژ^۱ رخ می دهد. ۲۴ ساعت پس از لقاح جنین ها در بلاستولا قرار دارند. گاسترولاسیون از حدود ساعت ۴۸ آغاز می شود و در ۷۲ ساعت به

- 1 - Cyst
- 2 - Diapause
- 3 - Gastrula

مرحله نهایی خود می‌رسد. تا این مرحله جنین‌های هر دو مسیر، سیر تکاملی یکسانی طی کرده‌اند. اما در همین زمان رشد جنین‌های دارای سرنوشت دیاپوزی^۱ متوقف شده، دارای پوسته ضخیمی گشته و بصورت جنین دارای پوسته یا سیست رها می‌گردند. در حالیکه جنین‌های تکامل تخمگذار-زنده زا به رشد خود ادامه داده و بصورت لارو شناگر آزاد رها می‌شوند (شکل ۱-۳) [۱۵].



شکل ۱-۳: مراحل تکامل مستقیم و دیاپوزی طی روزهای پس از لقاح. (A-D) مراحل تکامل مستقیم که منجر به رهایی لارو شناگر آزاد می‌گردد. (E-H) مراحل تکامل دیاپوزی که در روز پنجم پس از لقاح جنین دارای پوسته رها می‌گردد [۱۵].

۱-۱-۳ راز بقای آرتمیا در شرایط استرسی

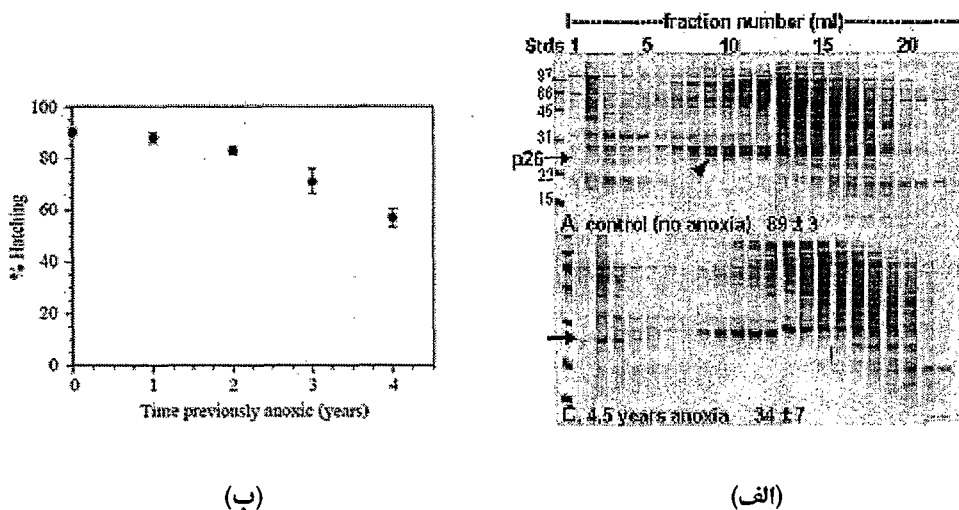
جنین خفته آرتمیا توانایی خارق العاده‌ای در تحمل شرایط بسیار سخت محیطی از خود نشان می‌دهد که بقای آن را در فقدان اکسیژن، دمای بسیار بالا، خشکی شدید و بمباران توسط اشعه ی UV رقم می‌زند. ابتدا نگاهی اجمالی به این شرایط استرسی داشته و سپس به تفصیل به بررسی عواملی می‌پردازیم که سیست‌ها مقاومت بی‌نظیر خود را مدیون این عوامل باشند. از آن جمله می‌توان به پروتئین‌های استرسی^۲ (p26، آرتمین^۴، ArHsp21)، دی ساکارید تره هالوز^۵ و پوسته ی ضخیم سیست اشاره نمود [۱۷-۱۵، ۵].

- 1 - Cleavage
- 2 - Diapause- destined embryos
- 3 - Stress proteins
- 4 - Artemin
- 5 - Trehalose

۱-۳-۱-۱ استرس های محیطی

۱. فقدان اکسیژن^۱: جنین گاسترولای دارای پوسته قادر است سالها فقدان اکسیژن را تحمل نماید. زمانیکه سیست ها توسط باد یا پرندگان به سواحل انتقال می یابند و زیر تل خاک و علف و توده ای از مواد بیولوژیک در حال فساد دفن می شوند، با کمبود یا فقدان اکسیژن مواجه می گردند. در این حالت که از آن به خاموشی^۲ تعبیر می شود، مسیرهای بیوستتیک متوقف شده، در این شرایط pH داخل سلولی به ۶/۶ می رسد. علیرغم عدم نوسازی^۳ پروتئین ها، الگوی پروتئینی سلول حفظ شده و اگرچه تعداد بسیار کمی از پروتئین ها دناتور شده و تجمع می یابند، اما اغلب آنها کانفورماسیون طبیعی خود را حفظ می نمایند (شکل ۱-۴). علاوه بر دناتوراسیون و تجمع پروتئین ها، پروتئولیز در غیاب بیوستتر تهدیدی دیگر برای آنها می باشد. مشخص شده است تحت این شرایط مسیر Ubiquitin مهار می شود.

توانایی سیست ها در مقابله با این استرس بعدی بالاست که وقتی پس از گذران ۴ سال فقدان اکسیژن مجدداً به شرایط هوایی برگردانده شدند، ۶۰ درصد آنها تفریح^۴ یافتند. این پایداری فوق العاده در غیاب بیوستتر و متابولیسم انرژی نیاز به مکانیسم هایی جهت ممانعت از Unfolding و تجمع پروتئین های کروی دارد که در بخش های بعدی بدان می پردازیم [۴،۵،۸،۱۸].



شکل ۱-۴: (الف) مقایسه پروفایل پروتئینی سیست در شرایط هوایی و بعد از طی دوران فقدان

اکسیژن پس از فیلتراسیون زلی، (ب) تغییرات درصد تفریح پس از طی دوران فقدان اکسیژن [۴]

- 1 - Anoxia
- 2 - Quiescence
- 3 - turnover
- 4 - hatch

۲. **دمای بسیار بالا:** سیست های آرتمیا از لحاظ تحمل دماهای بالا از جمله جانداران منحصر بفرد می باشند. سیست ها قادر به تحمل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت می باشند، بدون اینکه کوچکترین اثری روی تفریح آنها بگذارد. از عوامل بسیار مؤثر بر این سازش پروتئین های شوک حرارتی می باشند که به بررسی آنها خواهیم پرداخت [۱۷].

۳. **اشعه UV:** جنین های دارای پوسته زمانیکه روی سطح محیط زندگیشان شناورند و یا زمانیکه توسط باد به سواحل انتقال می یابند، بطور طبیعی در معرض اشعه UV قرار می گیرند. آنچه بیش از همه در مقاومت نسبت به UV به سیست ها یاری می رساند پوسته ضخیم آنها می باشد. در ابتدا گمان می رفت که cyst می بایست دارای مقادیر بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدان و آنزیم های حمایت کننده در برابر اشعه UV باشد. اما اطلاعات موجود در مورد حضور این ترکیبات (به جزء کاروتنوئیدها که حضورشان به اثبات رسیده است) بسیار اندک است و به نظر می رسد cyst شامل مقادیر زیادی از این نوع ترکیبات نباشد. غذای عمده آرتمیا را جلبک ها تشکیل می دهند که حاوی مقادیر بالایی از کاروتنوئیدها هستند و از آن جاییکه این ترکیبات قابلیت حل شدن در چربی درون اوویست ها را دارند لذا می توانند بخش مهمی از چربی های cyst را شامل شوند. کاروتنوئیدها از مواد آنتی اکسیدان مهم هستند که نقش اصلی آنها خنثی سازی رادیکال های آزاد است. اما میزان این ترکیبات در آرتمیا به اندازه ای بالا نیست که بتواند مسئولیت اصلی مقاومت در برابر اشعه UV را به تنهایی عهده دار باشد. علاوه بر کاروتنوئیدها مقادیر اندکی از ویتامین های A، C و گلوکوتایون هم در آرتمیا یافت شده است. همچنین آنزیم های مختلف با فعالیت آنتی اکسیدانی نظیر لیپوکسی ژناز، سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و گلوکوتایون ردوکتاز در سطوح بسیار پایین وجود دارد. به همین علت نمی توان آنها را عامل اصلی حمایت در برابر اشعه UV در نظر گرفت. لذا می بایست عنوان نمود که سیستم اصلی و مهم cyst های آرتمیا جهت حمایت در برابر اشعه UV همان پوسته cyst است که در بخش های بعدی بدان خواهیم پرداخت [۱۶، ۱].

۴. **خشکی شدید:** یکی دیگر از استرس های فیزیولوژیک که سیست ها قادر به مقاومت در برابر آن می باشند خشکی است، آنهم خشکی شدیدی که حتی اندازه گیری مقدار آب باقی مانده ممکن نمی باشد [۱۷].

۱-۲ عوامل مؤثر بر مقاومت جنین آرتمی

همانگونه که اشاره گردید، جنین آرتمی توانایی بارزی در مواجهه با استرس های شدید محیطی از خود نشان می دهد. در این بخش به بررسی عواملی که جنین مقاومت بی نظیری را به این جاندار اعطاء نموده اند می پردازیم.

۱-۲-۱ پروتئین های شوک حرارتی کوچک^۱

این خانواده ی پروتئینی به چند گروه تقسیم می شوند: پروتئین های شوک حرارتی Hsp 60, 70, 90, 100 و پروتئین های شوک حرارتی کوچک α -کریستالین که p26 جزء این دسته می باشد. α -کریستالین^۲ ها پروتئین هایی با وزن ملکولی ۱۵ - ۳۰ kDa هستند که به اجزایی با تعداد مونومرهای متفاوت الیگومریزه می شوند. مونومرهای آنها دارای دمین^۳ حفاظت شده α -کریستالین می باشند که حاوی حدود ۹۰-۱۰۰ آمینواسید است و توسط دمین های انتهای کربوکسی و آمینو احاطه می شوند. دمین α -کریستالین در تشکیل دایمرها که واحدهای الیگومریزاسیون sHsp ها هستند و انتهای آمین در اتصال سوستر و دینامیک الیگومر نقش ایفا می کنند. در حالیکه انتهای کربوکسی که باردار و انعطاف پذیر است، موجب افزایش حلالیت شده و الیگومریزاسیون را تعدیل می کند. sHsp ها یک خط دفاعی اولیه در برابر استرس می باشند که این وظیفه را با اتصال به پروتئین های دناتور، ممانعت از دناتوراسیون برگشت ناپذیر، تسهیل رناتوراسیون آنها و نیز همکاری با سایر چپرون های ملکولی ایفا می کنند. این پروتئین ها جهت عملکرد خود نیازی به ATP ندارند. دو α -sHsp شناخته شده در آرتمی، p26 و ArHsp21 می باشند [۲۷-۲۰].

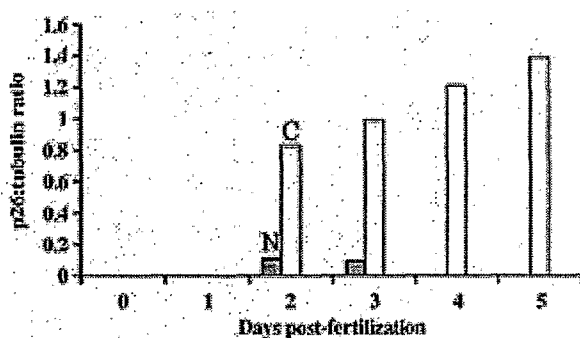
۱-۱-۲-۱ پروتئین استرسی p26

p26 یک پروتئین شوک حرارتی کوچک (sHsp) است که ۱۵-۱۲ درصد پروتئین های غیر زرده ای سیست را تشکیل می دهد و در حفاظت جنین آرتمی از استرس های محیطی که طی دیاپوز متحمل می شود نقش بسیار مهمی ایفا می کند. این پروتئین اولین α -کریستالین تعیین توالی شده در سخت پوستان است و تاکنون در هیچیک از جانداران، حتی در سخت پوستان نزدیک به آرتمی نیز یافت نشده و بعنوان پروتئین ویژه جنس آرتمی شناخته شده است. p26 طبیعی با وزن ملکولی ۷۰۰kDa از ۲۷ زیرواحد ۲۶

1 - Small heat shock proteins (sHsp)
2 - α -Crystallin
3 - Domain

کیلودالتونی تشکیل شده است و بصورت اجزایی با قطر 15nm زیر میکروسکوپ الکترونی مشاهده گردیده است. ساختار دوم آن بطور غالب β -sheet می باشد. cDNA ی آن دارای یک چهارچوب خواندن باز^۱ است که پلی پپتیدی ۱۹۲ آمینواسیدی یعنی همان p26 را کد می کند.

mRNA ی p26 در جنینی که تکامل تخمگذار را طی میکند (سیست)، دو روز بعد از لقاح ظاهر شده و تا زمان رهایی سیست از جاندار ماده افزایش می یابد. در حالیکه در جنین مسیر تکاملی تخمگذار- زنده را فقط در روز دوم و سوم پس از لقاح مشاهده می شود. با این وجود، حتی در روز سوم پس از لقاح نیز در سیست ها ۱۰ برابر بیش از جنین های تخمگذار-زنده را می باشد (شکل ۱-۵).



شکل ۱-۵: بررسی میزان mRNA و زمان ظهور و ناپدید شدن آن در جنین تکامل تخمگذار (C) و جنین تکامل تخمگذار-زنده (N) [۲۶].

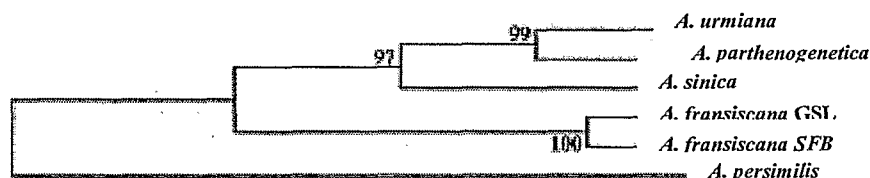
پروتئین p26 از مرحله ی گاسترولاهی جنین های دارای سرنوشت دیابوزی ظاهر شده و تجمع آن تا رهاشدن سیست ها از جاندار ماده ادامه می یابد. این پروتئین ویژه ی جنین بوده و در لارو و سایر مراحل زندگی ملاحظه نمی شود. محدودیت p26 به جنین خفته، آنرا بعنوان یک چپرون ملکولی^۲ جهت مقابله با استرس های محیطی مطرح می کند. علیرغم سایر α -Hsp ها که معمولاً به مقدار اندکی در سلول وجود دارند و بیان آنها طی استرس افزایش می یابد، p26 بعنوان بخشی از برنامه تکاملی جاندار سنتز می شود نه در پاسخ به استرس ها. با وجود این شرایط، مقدار بالای p26 (۱۵-۱۲ درصد پروتئین های غیر زرده ای) در مقایسه با مقدار بیشینه α -Hsp های القاء شده توسط شوک حرارتی (۱/۱ درصد پروتئین های سلولی) بسیار چشمگیر می باشد. این مقدار زیاد قبل از وقوع استرس های محیطی سیست را جهت مواجهه با شرایط سختی که پس از رهایی از ماده با آن روبرو می شود آماده می سازد [۲۸-۲۶].

1 - Open reading frame (ORF)

2 - Molecular chaperone

۱-۲-۱-۱-۱ مقایسه p26 در گونه های مختلف آرتمیا

چهارچوب خواندن باز cdNA ی آرتمیا فرانسیسکانا^۱ و سینیکا^۲ شامل ۵۷۶ و اورمیا، پرسیمیلس^۳ و پارتنوجنتیکا^۴ بترتیب دارای ۵۷۶، ۵۸۸ و ۵۸۵ نوکلئوتید می باشد. با مقایسه cdNA ی p26 گونه های مختلف آرتمیا، برای اولین بار ارتباط فیلوژنتیک آنها بر اساس توالی های cdNA ی ژن کد کننده یک پروتئین هسته ای بررسی گردید. ارتباط نزدیکی بین آرتمیا اورمیا، آرتمیا پارتنوجنتیکا و نیز آرتمیا سینیکا وجود دارد. اما گونه های آرتمیا فرانسیسکانا و آرتمیا پرسیمیلس از انواع نامبرده فاصله گرفته اند. ساختارهای پیش بینی شده p26 گونه های مختلف آرتمیا از ۷ رشته ی β تشکیل شده که توسط لوپ ها بهم متصلند (شکل ۱-۶، الف). Arg119، موتیف های WD/EPF انتهای آمینو و VPI انتهای کربوکسی، در همه گونه های آرتمیا حفظ شده اند. از بین ۹۳ آمینو اسید دمین α -کریستالین نیز اختلاف فقط در ۶ آمینو اسید ملاحظه می شود. برخی تغییرات در انتهای کربوکسی آرتمیا پرسیمیلس و پارتنوجنتیکا موجب افزایش حلالیت و پایداری ساختار چهارم p26 این گونه ها می گردد. همچنین جانشینی های T150K، A66D در p26 آرتمیا اورمیا ایجاد یک پل نمکی کرده که موجب تاخوردگی دنباله C-ترمینال بسمت عقب و روی دمین α -کریستالین می شود. K150 حلالیت پروتئین را نیز افزایش می دهد. در مجموع طی مقایسه توالی p26، انتهای کربوکسی ۲۵٪، انتهای آمینو ۱۶/۹٪ و دمین α -کریستالین ۶/۶٪ تفاوت را بین گونه های مختلف آرتمیا نشان می دهد [۲۹-۳۱].



(الف)

- 1 - *A. Fransiscana*
- 2 - *A. Sinica*
- 3 - *A. Persimilis*
- 4 - *A. Parthenogenetica*
- 5 - β -strand