بنام خداوند بخشنده مهربان

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری تخصصی (Ph.D) در رشته بیوشیمی

عنوان:

طراحی و ساخت گزارشگر دوبخشی لوسیفراز(Split luciferase) جهت تشخیص زود هنگام آپوپتوز

نگارش:

مسعود ترکزاده ماهانی

استاد راهنما:

دکتر سامان حسینخانی

استاد مشاور:

دکتر مریم نیکخواه

بهمن 1391

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

« اینجانب **مسعود ترکزاده ماهانی** دانشجوی رشته **بیوشیمی** ورودی سال تحصیلی 1387 مقطع **دکتری** دانشکده **علوم زیستی** متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم »

مسعود ترکزاده ماهانی

1391/11/2

تقدیم به همسرعزیز و پسر دلبندم

به پاس سالها همراهی وشکیبایی

سپاس گزاری

با حمد و سپاس خداوند تبارک و تعالی

با تشکر و سپاس فراوان از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سامان حسینخانی که راهنمایی این رساله را بر عهده داشتند و با حسن اخلاق همواره اینجانب را از رهنمودهایشان بهرمند فرمودند.

با تشکر و سپاس فراوان از استاد ارجمند سرکار خانم دکتر مریم نیکخواه که مشاوره پایان نامه اینجانب را بر عهده داشتند و با رهنمودهای علمی در به پایان رساندن این رساله مشوق اینجانب بوده‌اند. با تشکر و قدردانی ویژه از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر خواجه ، جناب آقای دکتر میرشاهی و جناب آقای دکتر ساجدی که در دوران تحصیل از محضرشان کسب علم و اخلاق نموده‌ام.

از همکاری صمیمانه دوستان محترم آزمایشگاه، سرکار خانم عطائی, سرکار خانم کریم زاده, سرکار خانم پیروزمند, جناب آقای دکتر مرتضوی، جناب آقای صالحی و سایر دوستانم تشکر و قدردانی می‌کنم.

با تشکر فراوان از کارشناسان محترم آزمایشگاه‌های بیوشیمی و بیوفیزیک سرکار خانم زرندی و سرکار خانم جعفری که با حسن اخلاق و احساس مسئولیت بالا در راه تحقیق و پژوهش پشتیبان اینجانب بوده‌اند.

قدردانی ویژه از همسر و پسر دلبندم که در سال‌های طولانی تحصیل همواره با دعای خیر پشتیبانم بوده‌اند.

در پایان برخود لازم می‌دانم از زحمات کلیه اساتید محترمی که در دوره تحصیل از محضرشان کسب علم نموده‌ام صمیمانه تشکر نموده و برای همه آن‌ها آرزوی سلامتی و سعادت داشته باشم.

چکیده

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول یک نوع از مرگ سلولی می باشد که موجودات چند سلولی جهت حذف سلول های نا مناسب از آن استفاده می نمایند. نکته مهم در خلال حذف این نوع سلول ها این است که فرایند آپوپتوز به حدی کنترل شده و ایمن باشد که به ساختارهای مجاور هیچ نوع آسیبی وارد نشود. در این مطالعه با استفاده از دیدگاه Protein Complementation Assay و تکنولوژی گزارشگر های دو بخشی لوسیفراز یک روش سلولی جدید جهت سنجش آپوپتوز در سطح تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم و اولیگو مریزه شدن مولکول Apaf1 در مراحل بسیار ابتدائی آپوپتوز ارائه گردید. در این روش ابتدا قطعه آمین آنزیم لوسیفراز (اسید آمینه های 1-416) به سمت آمین مولکول Apaf1 متصل گردید. سپس قطعه کربوکسی آنزیم لوسیفراز (اسید آمینه های 395-550) به سمت آمین یک Apaf1 دیگر متصل گردید. سلول های ترانسفکت شده با این دو سازه نوترکیب تحت القاء آپوپتوز با داروی Doxorubicin در غلظت 0.5میکرو مولار قرار گرفتند. آنالیز های انجام شده جهت سنجش فعالیت لوسیفراز افزایش 15 برابری را تنها چهار ساعت پس از القاء آپوپتوز نشان می داد و این افزایش فعالیت در ظرف مدت 10 ساعت پس از القاء آپوپتوز به 155 برابر در مقا یسه با حالت کنترل می رسد. مقایسه نتایج حاصل از این روش با روش مبتنی بر استفاده از سوبسترای فلوروسنت که کاسپاز های فعال شده 3 و 7 را اندازه کیری می کند نشان می داد که از نظر زمانی روش ارائه شده 5 ساعت زودتر توان اندازه گیری آپوپتوز را دارا می باشد. همچنین نسبت افزایش سیگنال مشاهده شده در دو سیستم نشان دهنده بهبود وضعیت Signal/Noise در سیستم لوسیفراز دو بخشی می باشد. این سیستم گزارشگر می تواند به صورت موثری جهت بررسی پتانسیل شیمی درمانی ترکیبات متفاوت و همچنین مطالعات غلظتی و زمانی این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گزارشگر دو بخشی, Apaf1, آپوپتوز, آپوپتوزوم, لوسیفراز , Doxorubicin

عنوان .....صفحه
فصل ۱ مقدمه ۱
۱-۱- مرگ برنامه ریزی شده سلول ۲
۱-۲- آپوپتوز و نکروز ۲
۱-۳- آپوپتوز و شکل های دیگر مرگ سلول ۴
۱-۴- مکانیسم های آپوپتوز ۶
۱-۵- شروع آپوپتوز ۷
۱-۶- چگونه پروتئین های پروآپوپتوزی فعالیت می کنند؟ ۱۱
۱-۷- پروتئین های خانواده *BCL-2* ۱۲
۱-۸- نفوذ پذیر نمودن غشاء خارجی میتوکندری ۱۳
۱-۹- نظریه تشکیل کانال ۱۴
۱-۱۰- نظریه تخریب غشاء میتوکندری ۱۶
۱-۱۱- سیتوکروم-*c* ۱۷
۱-۱۱-۱- جداسازی سیتوکروم-*c* از غشاء داخلی میتوکندری ۱۹
۱-۱۱-۲- جا به جایی سیتوکروم-*c* از طریق غشاء خارجی میتوکندری ۲۱
۱-۱۲- اولیگومریزه شدن پروتئین *Bax* و*Bak* باعث تشکیل منافذ می شود ۲۱
۱-۱۳- آزاد شدن سیتوکروم-*c* از طریق کانال های سرآمیدی ۲۳
۱-۱۴- تنظیم آزاد سازی سیتوکروم –*c* ۲۴
۱-۱۵- اثرات تقویتی و مهاری پروتئین های اعضاء خانواده BCL_2 .....۲۴
۱-۱۶- برخی کاسپازها می توانند آزاد شدن سیتوکروم –*c* را کنترل نمایند ۲۵
۱-۱۷- پروتئین های شوک حرارتی بر روی آزادسازی سیتوکروم –*c* اثر دارند ۲۵
۱-۱۸- کلسیم در آزاد شدن سیتوکروم –*c* مداخله می کند ۲۶
۱-۱۹- آپوپتوزوم ۲۶
۱-۱۹-۱- ماهیت چند دومینی مولکول *Apaf1* (*Apoptotic Protease- Activating Factor 1*) .۲۸
۱-۲۰- تشکیل آپوپتوزوم ۳۴
۱-۲۱- روش های بررسی و مطالعه آپوپتوز ۳۶
1-21-1 تکنیک *TEM* ۳۶
۱-۲۱-۲- رنگ های فلورسنت ۳۶
۱-۲۱-۳- تکنیک *TUNEL* (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling*) ۳۷
۱-۲۱-۴- تکنیک *Flow cytometry* ۳۸
۱-۲۱-۵- تکنیک های بیوشیمیایی ۳۸
۱-۲۱-۵-۱-فعالیت کاسپازها ۳۸

۱-۲۱-۶- تکنیک های مولکولی ۴۱
۱-۲۱-۶-۱-الکتروفورز ژل آگارز *DNA* ۴۱
۱-۲۱-۶-۲- وسترن بلاتینگ ۴۱
1-21-6-3- واکنش نسخه برداری معکوس ۴۱
۱-۲۲- گزارشگرهای دو بخشی (*Split reporters*) ۴۲
۱-۲۲-۱- گزارشگرهای دو بخشی لوسیفراز ۴۴
۱-۲۳- کاربردهای گزارشگرهای دو بخشی لوسیفراز ۴۵
۱-۲۴- بیان در سیستم‌های یوکاریوتی ۴۵
۱-۲۴-۱- بیان در مخمر ۴۶
۱-۲۴-۲- سویه های بیانی پیکیا ۴۷
۱-۲۴-۳- خصوصیت ناقل های پیکیا ۴۸
۱-۲۵- هدف از انجام کار ۵۰
فصل ۲ مواد و روشها ۵۱
۲-۱- استخراج *RNA* کل از بافت ۵۲
۲-۱-۱- موارد لازم قبل از انجام مراحل استخراج ۵۲
۲-۱-۲- یکنواخت کردن بافت ۵۳
۲-۱-۳- تخلیص *RNA* ۵۳
۲-۱-۴- حل کردن و نگهداری *RNA* کامل ۵۴
۲-۱-۵- بررسی کمی و کیفی *RNA* استخراج شده ۵۴
۲-۱-۵-۱- اسپکتروفوتومتری ۵۴
۲-۱-۵-۲- مراحل انجام کار ۵۴
۲-۱-۵-۳- الکتروفورز ژل آگارز ۵۵
۲-۱-۵-۴- با فرالکتروفورز ۵۵
۲-۱-۵-۵- محلول اتیویوم یروماید ۵۵
۲-۱-۵-۶- با فر بارگذاری (*Loading buffer*) ۵۵
۲-۱-۵-۷- روش انجام الکتروفورز ۵۶
۲-۲- پرایمر ۵۶
۲-۲-۱- طراحی پرایمرهای کلونینگ ژن *Apaf I* ۵۷
۲-۳- واکنش (*RT*) نسخه برداری معکوس ۵۷
۲-۴- واکنش *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) ۵۸
۲-۵- پاکسازی محصول *PCR* ۵۹
۲-۶- کلونینگ ژن *ApafI* در ناقل *pET28a* ۵۹
۲-۶-۱- مشخصات و نقشه ناقل *pET28a* ۶۰

۲-۶-۲- تهیه ناقل نوترکیب «*Miniprep*» ۶۱
۲-۶-۳- هضم محصول *PCR* و ناقل *pET28a* با آنزیم های *XhoI* و *BamHI* ۶۲
۲-۶-۴- کلونیک ژن *ApafI* در ناقل *pET 28a* ۶۳
۲-۶-۵- انتقال ناقل نوتوکیب به میزبان (*Transformation*) ۶۳
۲-۶-۵-۱- تهیه باکتری فوق مستعد (*Ultra competent*) ۶۴
۲-۶-۵-۲- آماده سازی باکتری فوق مستعد ۶۴
۲-۶-۵-۳- انتقال پلاسمید به میزبان (*Transformation*) ۶۵
۲-۶-۵-۴- غربال گری کلون های رشد یافته (*Screening*) ۶۶
۲-۶-۵-۵- تعیین توالی پلاسمید نوتوکیب ۶۶
۲-۷- کلونینگ و بیان ژن *ApafI* در سیستم مخمر ۶۷
۲-۷-۱- مشخصات ناقل *pPICZa* ۶۷
۲-۷-۲- طراحی پرایمر کلونینگ و تکثیر ژن *ApafI* با استفاده از *PCR* ۶۷
۲-۷-۳- تهیه ناقل *pPICZa*، الحاق و غربالگری کلونی های حاوی *ApafI* ۶۸
۲-۷-۴- استخراج ناقل نوترکیب *pPICZa /ApafI* از سویه *XL10 Gold* و انتقال به پیکیا پاستوریس ۶۹
۲-۷-۴-۱- استخراج ناقل نوترکیب و هضم توسط *Sac1* ۶۹
۲-۷-۴-۲- تهیه سلول های مستعد پیکپا پاستوریس (*Pichia pastoris*) ۷۰
۲-۷-۴-۳- انتقال ناقل خطی شده به سلول های پیکیا ۷۰
۲-۷-۴-۴- غربال گری سلول های پیکیای حاوی ژن *ApafI* ۷۱
۲-۷-۴-۵- مطالعه بیان ژن *ApafI* در کلونی های غربال شده ۷۲
۲-۷-۴-۶- تهیه محتوای سلولی از پیکیا پاستوریس ۷۲
۲-۷-۴-۷- بررسی بیان با تکنیک *SDS-PAGE* ۷۳
۲-۷-۴-۸- آماده سازی ژل و بارگذاری نمونه ها ۷۳
۲-۷-۴-۹- رنگ آمیزی ژل ۷۵
۲-۷-۴-۱۰- وسترن بلات ۷۵
۲-۸- طراحی گزارشگر دو بخشی آپوپتوز ۷۷
۲-۸-۱- طراحی محل مناسب جهت دو بخشی نمودن گزارشگر لوسیفراز ۷۷
۲-۸-۲- انتخاب لوسیفراز ۷۷
۲-۸-۳- طراحی رابط (*Linker*) جهت اتصال قطعات لوسیفرازبه مولکول *ApafI* ۷۸
۲-۹- طراحی پرایمرهای کلونینگ جهت ساخت گزارشگر دو بخشی ۷۸
۲-۹-۱- نقشه و مشخصات پلاسمید *Plox-cw* ۷۸
۲-۹-۲- طراحی پرایمرهای کلونینگ گزارشگر دو بخشی ۸۰
۲-۹-۳- کلونینگ قطعات گزارشگر دو بخشی در وکتور *Plox-cw* ۸۱
۲-۹-۳-۱- بریدن قطعه *GFP* از درون پلاسمید *Plox-cw* ۸۱

۲-۹-۳-۲-*PCR* قطعات مختلف گزارشگر ۸۲
۲-۹-۳-۳- کلونینگ قطعات در پلاسمید *Plox-cw* ۸۲
۲-۹-۳-۳-۱- هضم محصولات *PCR* مربوط به *Apaf1* و ناقل *Plox-cw* ۸۲
۲-۹-۳-۳-۲- هضم محصولات *PCR* قطعات لوسیفراز و ناقل نوترکیب *Plox-cw/ApafI*..... ۸۳
۲-۹-۳-۳-۳- نگهداري طولاني مدت ناقل هاي نوترکیب ۸٤
۲-۹-۴- مشخصات و نقشه ناقل *pcDNA3.1 (+)* ۸۴
۲-۹-۵- طراحی پرایمرهای کلونینگ جهت ساخت سازه های گزارشگر دو بخشی ۸۵
۲-۹-۶- کلونینگ سازه ها در ناقل *pcDNA 3.1* ۸۶
۲-۹-۶-۱- تهیه ناقل *pcDNA3.1* ۸۶
۲-۹-۶-۲- واکنش *PCR* سازه ها ۸۶
۲-۹-۶-۳- هضم محصولات *PCR* و ناقل *pcDNA 3.1* ۸۷
۲-۹-۶-۴- کلونینگ سازه ها در ناقل *pcDNA3.1* ۸۷
۲-۱۰- کشت سلول و انتقال سازه ها (*Transfection*) به داخل سلول های *HEK293T* ۸۸
۲-۱۰-۱- کشت سلول های منجمد شده ۸۸
۲-۱۰-۲ -انجماد سلول (*Cryopreservation*) ۸۸
۲-۱۰-۳- انتقال سازه ها به داخل سلول های *HEK293T* ۸۹
۲-۱۰-۴- تهیه محتوی سلولی از سلول های ترانسفکت (*Transfect*) شده ۹۱
۲-۱۰-۵- اندازه گیری فعالیت لوسیفراز در سلول های ترانسفکت شده ۹۲
۲-۱۰-۶- تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم در شرایط درون سلولی ۹۳
۲-۱۱-*Doxorubicin* عامل ایجاد آپوپتوز در سلول های سرطانی ۹۳
۲-۱۲- بهینه سازی القاء آپوپتوز توسط *Doxorubicin* در سلول های *HEK293T* ۹۴
۲-۱۳- اندازه گیری کاسپازهای *3* و*7* فعال شده ۹۵
۲-۱۴- زمان بهینه تاثیر *Doxorubicin* ۹۷
۲-۱۵- ارزیابی فعالیت لوسیفراز در سلولهای ترانسفکت شده و تحت القاء آپوپتوز ۹۸
۲-۱۵-۱- ارزیابی فعالیت لوسیفراز در محتوی سلولی ۹۸
۲-۱۵-۲- ارزیابی فعالیت لوسیفراز در سلولهای سالم ۹۸
۲-۱۵-۳- ارزیابی فعالیت لوسیفراز در سلولهای سالم در غلظت های متفاوت *Doxorubicin* ۹۹
۲-۱۶- ارزیابی فعالیت لوسیفراز هر یک از سازه ها ۹۹
۲-۱۷- پایدارسازی سازه های نوترکیب با استفاده از وکتورهای لنتی (*Lenti*) ۱۰۰
۲-۱۷-۱- تهیه وکتور کنترل ویروسی ۱۰۰
۲-۱۷-۱-۱- طراحی پرایمرهای کلونینگ ژن لوسیفراز ۱۰۰
۲-۱۷-۱-۲- تهیه ذرات ویروسی ۱۰۱
۲-۱۷-۱-۳- تغلیظ ذرات ویروسی ۱۰۳
۲-۱۷-۱-۴- انتقال ویروس به سلولهای جدید(*Transduction*) ۱۰۴
۲-۱۸- تعیین غلظت پروتئین با استفاده از کیت *Thermo* به روش (*BCA*) ۱۰۵

۲-۱۹- استخراج پروتئین کل از سلولهای ترانسفکت شده ۱۰۶
فصل ۳ نتایج ۱۰۸
۳-۱- استخراج *RNA* کل ۱۰۹
۳-۱-۱- بررسی کمی و کیفی *RNA* استخراج شده ۱۱۰
۳-۲- واکنش *RT-PCR* ۱۱۱
۳-۳- استخراج ناقل *pET28a* در مقیاس کم (*Miniprep*) ۱۱۳
۳-۴- هضم آنزیمی ناقل *PET28a* ۱۱۴
۳-۵- کلونینگ ژن *Apaf1* ۱۱۵
۳-۵-۱- واکنش الحاق (*Ligation*) ۱۱۵
۳-۵-۲- انتقال ناقل نوترکیب به داخل باکتری (*Transformation*) و تائید کلونینگ ۱۱۶
۳-۶- کلونینگ ژن *Apaf1* در ناقل مخمری (*pPICZA*) ۱۱۸
۳-۶-۱- طراحی پرایمرهای کلونینگ و انجام *PCR* ۱۱۸
۳-۶-۲- استخراج ناقل *pPICZA* و هضم دوگانه ۱۱۸
۳-۶-۳- انتقال ناقل نوترکیب *pPICZA -Apaf1* به داخل ژنوم پیکیا پاستوریس سویه *X33* ۱۲۲
۳-۶-۳-۱- خطی سازی ناقل نوترکیب ۱۲۲
۳-۶-۳-۲- انتقال ناقل نوترکیب خطی به درون پیکیا پاستوریس ۱۲۲
۳-۶-۳-۳- غربال گری سویه های *X-33* حاوی ژن *Apaf1* ۱۲۳
۳-۷- بررسی بیان ژن *Apaf1* در میزبان مخمری ۱۲۴
۳-۷-۱- بررسی بیان ژن در سطح نسخه برداری ۱۲۴
۳-۷-۲- بررسی بیان پروتئین *Apaf1* در سیستم بیانی پیکیا *X-33* ۱۲۶
۳-۷-۳- وسترن بلات ۱۲۸
۳-۸- کلونینگ در سیستم بیانی *pLOX/CW* ۱۲۹
۳-۸-۱- تکثیر قطعات مورد نیاز ۱۲۹
۳-۸-۱-۱- تکثیر ژن *Apaf1* ۱۲۹
۳-۸-۱-۲- تکثیر قطعات *N-luc* و *C-luc* ۱۳۰
۳-۸-۲- کلونینگ ژن *Apaf1* در ناقل *pLOX/CW* ۱۳۲
۳-۸-۲-۱- کلونینگ قطعات *N-luc* و *C-luc* در ناقل نوترکیب *pLOX/CW-Apaf1* ۱۳۴
۳-۹- کلونینگ سازه های *Nluc-Apaf1* و *Cluc-Apaf1* در ناقل *pCDNA 3.1* ۱۳۸
۳-۹-۱- واکنش *PCR* مربوط به سازه های *Nluc-Apaf1* و *Cluc-Apaf1* ۱۳۸
۳-۱۰- انتقال ناقل های نوترکیب *pCDNA/Nluc-Apaf1* و *pCDNA/Cluc-Apaf1* به داخل سلول های یوکاریوت ۱۴۱
۳-۱۰-۱- بهینه سازی القاء آپوپتوز در سلول های ترانسفک شده ۱۴۲
۳-۱۰-۱-۱- بهینه سازی غلظت ۱۴۲
۳-۱۰-۱-۲- بهینه سازی زمان القاء آپوپتوز ۱۴۳

۳-۱۰-۲- اندازه گیری فعالیت لوسیفراز در سلول های ترانسفکت شده و تحت القاء آپوپتوز ۱۴۵
۳-۱۰-۲-۱- اندازه گیری فعالیت لوسیفراز در عصاره سلولی ۱۴۵
۳-۱۰-۲-۲- ارزیابی فعالیت لوسیفرازدر سلول های سالم(*Intact cell*) ۱۴۹
۳-۱۰-۲-۳- اندازه گیری فعالیت لوسیفرازهر یک از سازه های نوترکیب ۱۵۱
۳-۱۱- پایدار سازی سازه های نوترکیب ۱۵۲
فصل ۴ بحث ۱۵۶
۴-۱- طراحی گزارشگر دو بخشی لوسیفراز ۱۵۹
۴-۲- کلونیگ ژن *Apaf1* از بافت طحال و سلولهای *HepG2* ۱۵۹
۴-۳- بررسی فعالیت هر یک از سازه های نوترکیب ۱۶۰
۴-۴- القاء آپوپتوز توسط *Doxorubicin* ۱۶۱
۴-۵- فعالیت لوسیفرازی گزارشگر دو بخشی آپوپتوز در سلولهای ترانسفکت شده ۱۶۲
۴-۶- فعالیت لوسیفرازی گزارشگر دو بخشی در سلولهای پایدار شده ۱۶۵
۴-۷- بیان در پکیا پاستوریس ۱۶۶
۴-۷-۱- بیان در سطح نسخه برداری ۱۶۷
۴-۷-۲- بیان در سطح پروتئین ۱۶۷
فصل ۵ پیشنهادات ۱۶۸
فصل ۶ مراجع ۱۷۰

فصل 1: مقدمه

1-1- مرگ برنامه ریزی شده سلول

آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه ریزی شده سلول (programmed cell death) یکی از مهمترین فرآیندهای فیزیولوژیکی در تکوین و حفظ هموستازی موجودات چندسلولی می باشد(1-3). اختلال در این فرآیند حیاتی منجر به ایجاد بیماریهای گسترده ای همچون انواع کم خونی ها، سرطان، بیماریهای تحلیل برنده سیستم عصبی و بیماریهای خود ایمنی می گردد (2,3).

1-2- آپوپتوز و نکروز

مرگ سلولی یکی از مباحث مهم را در علم زیست شناسی تشکیل می دهد. از زمان مشاهده طبیعی این پدیده در 170 سال قبل، این نکته که مرگ برنامه ریزی شده یک پدیده غیرقابل اجتناب برای سیستم های بیولوژیک می باشد مشخص گردید. مطالعات اولیه انجام شده بر روی لاروهای کرم ابریشم و قورباغه نشان داد که مرگ سلولی می تواند با واسطه برخی از مهار کننده های پروتئینی و مهارکننده های سنتز RNA به تاخیر انداخته شود و همچنین بقاء سلولهای عصبی وابستگی به فاکتورهای خارج سلولی به نام نوروتروفین ها (Neurotrophin) دارد. اگر چه در ابتدا به نظر می رسید که نوروتروفین ها به عنوان یک فاکتور تغذیه ای در حفظ بقاء سلول مورد نیاز می باشند اما بعداً مشخص گردید که این فاکتورها در واقع مهار کننده شروع مرگ سلول می باشند (1,3).

حداقل دو نوع از مرگ سلولی را می توان در سیستم های چند سلولی از یکدیگر تشخیص داد. آپوپتوز (Apoptosis) و نکروز (Necrosis)، آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول یک مسیر به شدت برنامه ریزی شده و تحت کنترل، جهت حذف سلول های آسیب دیده، پیر و اضافی در یک مجموعه چندسلولی می باشد (1-3).

در هر ثانیه چندین میلیون سلول از بدن یک انسان درگیر آپوپتوز می شود. این مسئله بسیار محتمل می باشد که همه سلول های بدن انسان دارای پتانسیل ذاتی جهت آپوپتوز باشند.

اختلال در تنظیم آپوپتوز منجر به ایجاد اختلالات گسترده ژنتیکی، بیماریهای اتوایمیون و سرطان می شود. اگر چه فرآیند آپوپتوز هم در بحث سلامت و هم در بیماریها ضروری می باشد اما پدیده نکروز معمولاً در نتیجه یک آسیب شدید و جدی همچون کمبود ناگهانی اکسیژن، کمبود ناگهانی مواد غذایی همچون گلوکز و یا آسیب های شدید فیزیکوشیمیایی همچون حرارت و حلال ها به وجود می آید (3).

Kerr و همکارانش در سال 1972 برای اولین بار واژه آپوپتوز را که یک واژه یونانی بوده و به معنی فرو ریختن برگهای درختان یا گلبرگهای یک گل می باشد برای تفسیر مرگ برنامه ریزی شده سلول به کار بردند(4). اصطلاح آپوپتوز به تغییرات مورفولوژیکی یک سلول که درگیر مرگ برنامه ریزی شده باشد اطلاق می گردد که این تغییرات معمولاً به صورت چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته، برآمدگی های سطح غشاء، قطعه قطعه شدن غشاء پلاسمائی و تبدیل شدن آنها به اجسامی به نام اجسام آپوپتوزی (Apoptotic body) و تغییرات سطح غشاء که در نهایت به فاگوسیسته شدن سلول آپوپتوزی منجر می شود (5).

در خلال روند تکوین موجودات چندسلولی فرآیند مرگ سلولی، کمک بسیار مهمی به شکل دهی قسمت های مختلف بدن همانند تشکیل حفرات مختلف بدن و جداسازی انگشتان می نماید. این

فرآیند همچنین در موجودات بالغ و تکامل یافته، روند تقسیم سلولی را متعادل می سازد و باعث حفظ حجم بافت های مختلف می گردد. برداشت و حذف سلول های آسیب دیده در اثر آسیب های ژنتیکی، روند پیری، بیماریها و یا آسیب هایی ناشی از ترکیبات سمی از وظایف دیگر فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلول می باشد (1,2,5).

وضعیت های کنترل نشده فرآینده آپوپتوز شامل فعالیت بیش از حد لازم یا کمتر از میزان لازم با محدوده وسیعی از بیماریهایی همچون Ischemia، بیماریهای تحلیل برنده عصبی، بیماریهای اتوایمیون و عفونت های ویروسی مرتبط می باشد.

اگر چه فرآیند آپوپتوز به عنوان یک پدیده زیستی نزدیک به 3 دهه قبل معرفی گردید. اما درک ما از مکانیسم های پایه و اساسی که این پدپده را کنترل می نماید به تحقیقات یک دهه اخیر بر می گردد (3).

3-1- آپوپتوز و شکل های دیگر مرگ سلول

نکروز (Necrosis) حالت دیگری از مرگ سلول است که معمولاً در پاسخ به شرایطی همچون آسیب سلولی توسط سموم، محرک های شدید فیزیکی و یا کم خونی موضعی به وجود می آید(6). متورم شدن سلول ها و تخریب غشاء سلول از بارزترین ویژگی های فرآیند نکروز می باشند. در این نوع از مرگ سلولی به دلیل اینکه معمولاً تعداد زیادی از سلول ها به صورت هم زمان درگیر این فرآیند می شوند و به دلیل تخریب غشاء سلولی در مراحل اولیه، میزان زیادی از محتوی سلولی به فضای خارج سلولی آزاد می شوند. و عدم وجود فرآیند فاگوسیسته شدن برای سلولهای درگیر در این نوع از مرگ سلولی باعث می شودکه بافت های درگیر در این فرآیند پاسخ های التهابی شدیدی از خود نشان دهند. در مقابل، به دلیل اینکه تخریب غشاء سلولی در فرآیند مرگ برنامه ریزی شده در

مراحل آخر رخ می دهد و از آنجایی که زمان کافی برای حذف این سلول ها توسط سلولهای فاگوسیسته کننده وجود دارد معمولاً پاسخ های التهابی بسیار ضعیف و یا حتی در برخی موارد هیچ پاسخ التهابی دیده نمی شود. نمونه های بارزی از مورفولوژی سلولهای درگیردر فرآیند آپوپتوز را می توان در حذف برخی سلول ها در روند تکوین، تنظیم تعداد سلولهای یک بافت و در روند پیری مشاهده نمود. تعیین روند مرگ یک سلول (آپوپتوز یا نکروز) به مدت زمان و شدت محرک های آسیب رسان و میزان منابع تامین کننده انرژی سلولی بستگی دارد(3,6,7).

برخلاف آپوپتوز، فرآیند نکروز برای به وقوع پیوستن هیچ نیازی به منابع انرژی ندارد به همین دلیل محرک هایی که در حضور انرژی لازم در سلول باعث القاء آپوپتوز می شوند در عدم حضور انرژی به دلیل کاهش شدید سطح ATP سلولی باعث ایجاد نکروز می شوند(7).

بنابراین سلولهایی که ممکن است توسط محرک های استرس زا وارد فرآیند آپوپتوز شوند در صورت کاهش شدید سطح انرژی سلول یک فرآیند نکروز ثانویه را از خود نشان خواهند داد(7). موضوع همپوشانی بیوشیمیایی بین فرآیند آپوپتوز و نکروز ممکن است حتی پیچیده تر از این هم باشد و باعث به وجود آمدن تفسیرهای اشتباهی از مکانیسم های مرگ سلولی در بافت های معیوب به ویژه آسیب های به وجود آمده در اثر ایسکمی باشد. برای مثال شکست بین نوکلئوزومی رشته های DNA یا DNA Laddering که به وسیله رنگ آمیزی TUNEL یا الکتروفورز قابل تشخیص می باشد نمی تواند وجه تمایز فرآیند آپوپتوز و نکروز باشد. برای اینکه مسیرهای پروتئولیتیک که در فرآیند نکروز فعال می شوند، می توانند باعث فعال شدن آنزیم هایی شوند که باعث بریده شدن رشته DNA در فواصل نوکلئوزومی می شوند و این دقیقاً همان چیزی است که در فرآیند آپوپتوز قابل مشاهده است. بعلاوه جابه‌جایی فسفاتیدیل‌سرین از بخش داخلی غشاء پلاسمایی به سمت بخش خارجی غشاء

که اساس تشخیص فرآیند آپوپتوز بر اساس اتصال آنکسین v نشان دار با فسفاتیدیل‌سرین جابه جا شده می باشد در فرآیند نکروز هم قابل تشخیص است(3,6,8).

حتی اگر جابه‌جای فسفاتیدیل‌سرین در طی فرآیند نکروز روی ندهد به دلیل از دست رفتن یکپارچگی غشاء پلاسمایی در مراحل اولیه نکروز، دسترسی آسانی برای آنکسین v نشان دار جهت اتصال به فسفاتیدیل‌سرین به وجود خواهد آمد و باعث ایجاد یک پاسخ مثبت کاذب خواهد شد(3,8).

1-4- مکانیسم های آپوپتوز

برای اولین بار مکانیسیم های درگیر در فعال شدن و کنترل روند آپوپتوز با انجام تحقیقات ژنتیکی بر روی یک نماتد به نام C. elegans مشخص گردید. مرگ برنامه ریزی شده سلول در خلال تکوین C. elegans با فعال شدن ژنهای مرگ انتخابی همراه می باشد که دقیقاً 131 سلول را کشته و 959 سلول دیگر یک کرم سالم را باقی می گذارد. مطالعات بیشتر نشان داد که فرآیند آپوپتوز شامل 3 مرحله پی در پی می باشد(1,2,4-6).

مرحله اول اینکه هدایت سلول ها به سمت مرگ برنامه ریزی شده به وسیله یک سیگنال خارجی یا داخلی آغاز می شود.

دوم اینکه اجرای مسیر مرگ سلولی با فعال شدن یکسری از پروتئازهای داخل سلولی همراه می باشد.

و مرحله سوم اینکه سلولهای مرده توسط سلولهای دیگر پاکسازی می شوند(6,9).

این مراحل و ژنهایی که آنها را کنترل می کنند در طی مسیر تکامل از کرم تا انسان حفظ شده می باشد. در کرم *C. elegans* محصولات پروتئینی ژنهای CED-3 و CED-4 برای اجرای فرآیند آپوپتوز ضروری می باشند(5).

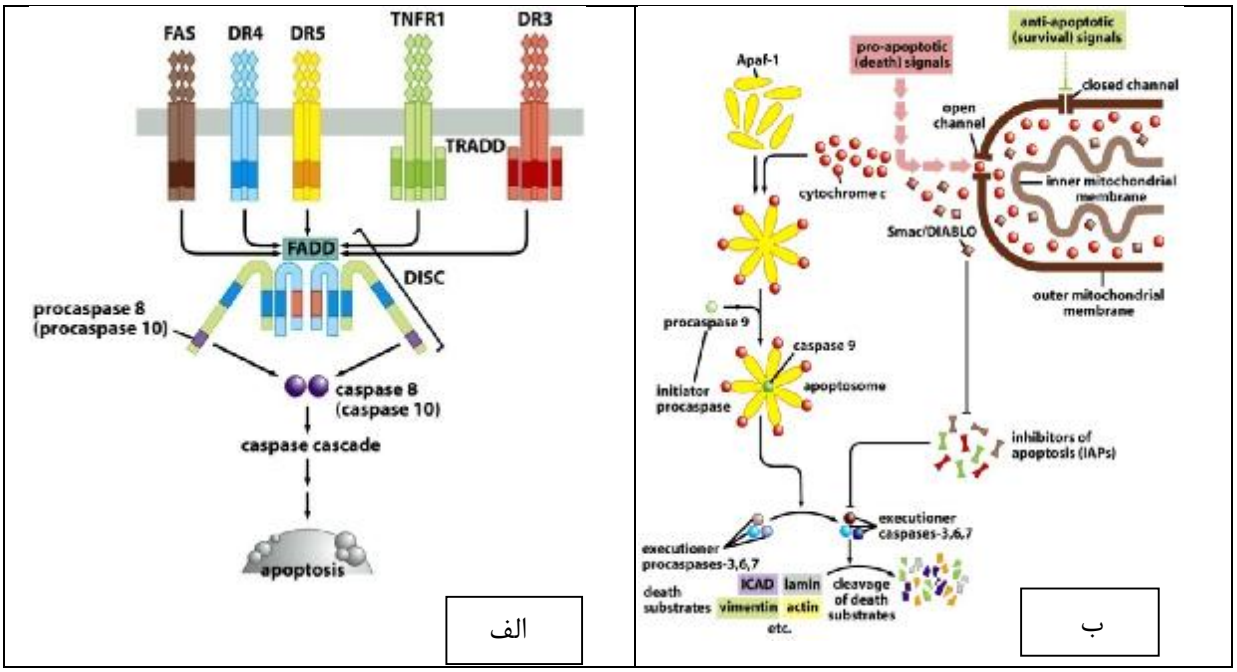
بعد از اینکه یک سلول سیگنال مرگ را دریافت می نماید مولکول CED-4 به مولکول غیرفعال پروتئین CED-3 متصل می شود که نتیجه این عمل فعال شدن مولکول CED-3 می باشد. CED-4 که یک پروتئین غشایی می باشد می تواند با اتصال به CED-4 مانع از فعال شدن CED-3 شود(5,6).

مرگ برنامه ریزی شده سلول در سلولهای پستانداران بسیار پیچیده تر از آن چیزی است که در کرم *C.elegans* اتفاق می افتد. اما به صورت کلی همگی آنها از یک الگو پیروی می کند. به محض دریافت سیگنال های موثرو فعال کننده آپوپتوز که منشاء آن می تواند داخل یا خارج سلولی باشد. این سیگنال توسط یکسری پروتئین های واسط به گروه خاصی از پروتئازها به نام کاسپازهای آغازگر(Initiator Caspase) منتقل می شود. در این مرحله سلول چاره ای جز وارد شدن به روند مرگ سلولی را ندارد و این فرآیند با فعال شدن گروه دیگری از پروتئازها به نام کاسپازهای اجرایی(Effector Caspase) کامل شده و سلول نابود می شود. در ادامه بقایای سلولی (اجسام آپوپتوزی) توسط سلولهای فاگوسیسته کننده از بین می روند. کاسپازهای آغازگر در پستانداران مشابه پروتئین CED-4 و کاسپازهای اجرایی نیز مشابه CED-3 در کرم C.elegans می باشند. در سلولهای پستانداران پروتیئن هایی همچون Bcl-2 , $Bcl\text{-}X_L$ وجود دارد که مشابه CED-2 در تنظیم فرآیند آپوپتوز نقش دارند(4,5,9-11).

1-5- شروع آپوپتوز

به طور کلی دو مسیر متفاوت برای شروع آپوپتوز وجود دارد. یکی از این مسیرها که خارج سلولی (Extrinsic pathway) نام دارد (شکل1-1) و با دخالت گیرنده های مرگ بر روی سطح سلول همراه می باشد. و مسیر دوم که به مسیر داخل سلولی یا مسیر میتوکندریایی (Intrinsic pathway) معروف می باشد (شکل1-1) و با آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری همراه است(2,6,10,12-14). در هر دو مسیر یک گروه خاص از پروتئازها به نام کاسپاز(Caspase) فعال می شوند که باعث شکسته شدن

برخی از پروتئین های داخل سلولی شده و در نهایت باعث بروز یک سری تغییرات مورفولـوژیکی مـی شوند که شاخصه فرآیند آپوپتوز (تشکیل اجسام آپوپتوزی) می باشد(10,15,16).



شکل1-1 مسیر های فعال شدن آپوپتوز الف- مسیر خارج سلولی فعال شدن آپوپتوز ب- مسیر داخل سلولی فعال شدن آپوپتوز

گیرنده های مرگ، عضو خانواده گیرنده های (Tumor Necrosis Factor) TNF می باشند کـه در این خانواده از گیرنده ها یک زیر خانواده وجود دارد که دارای یک دومین به نام دومین مـرگ(Death domain) می باشد، هنگامی که یـک لیگانـد هماننـد CD95, $TRAIL\text{-}R_1$ و $TRAIL\text{-}R_2$ بـه گیرنـده مرگ مربوط به خود متصل می شود. دومین های مرگ در داخل سـلول یـک سـری از پـروتئین هـای رابط درون سلولی را جذب می کنند که این پروتئین ها به نام پروتئین های FADD معروف هستند. (Fas-associated death domain) که این پروتئین ها نیز به نوبه خـود باعـث بـه وجـود آمـدن یـک مجموعه پروتئینی به نـام DISC (Death-Inducing Signaling Complex در زیـر سـطح غشـاء مـی شوند. سپس در سطح DISC پروکاسپازهای 8و 10 شکسته شده و کاسپازهای فعال آغازگر 8 و10 را