بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

خانم مرضیه معینی فرد رشته بیوشیمی بالینی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بررسی بیان ایزوآنزیم های ۵ ، ۹ فسفو دی استراز در بافت توموری سرطان سینه » در تاریخ ۱۳۹۰/۱۰/۱۱ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر صغری کرمی تهرانی	(استاد راهنما)	
دکتر مرتضی عطری	(استاد مشاور)	
دکتر محمد تقی خانی	(استاد ناظر)	
دکتر مجید سیرتی ثابت	(استاد ناظر)	
دکتر سید علیرضا مصباح نمین	(نماینده تحصیلات تکمیلی)	

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 ۱= 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 ۲- 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 دانشجوی 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 ۳- انتشار کتاب و یا 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 آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ٤- 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 ٥= این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **مرضیه معینی‌فرد** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین 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 آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ ۹۰/۱۰/۱۱

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **بیوشیمی بالینی** است که در سال ۱۳۹۰ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **خانم دکتر فاطمه کرمی تهرانی** ، مشاوره **آقای دکتر مرتضی عطری** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ٤ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ٤ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ٦ : اینجانب **مرضیه معینی‌فرد** دانشجوی رشته **بیوشیمی بالینی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی مرضیه معینی‌فرد

تاریخ و امضا

۹۰/۱۰/۱۱

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی بالینی

عنوان

بررسی بیان ایزوآنزیم‌های ۵ و ۹ فسفودی‌استراز در بافت توموری سرطان سینه

نگارش

مرضیه معینی فرد

استاد راهنما

دکتر فاطمه کرمی تهرانی

استاد مشاور

دکتر مرتضی عطری

دی ۱۳۹۰

تقدیم به:

کسانی که همواره در جستجوی حکمت هستند.

تشکر و قدردانی

پروردگارم را شکرگزارم که مرا در انجام این پروژه یاری نمود و سختی‌های راه را بر من هموار ساخت.

اکنون که به شکر خدا این تلاش اندک به بار نشسته است، لازم است از کسانی که در انجام این پروژه یاری ام نموده‌اند، تشکر کنم:

از حمایت‌های بی‌دریغ خانواده‌ی عزیزم که در این راه مرا یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌کنم.

از استاد محترم، سرکار خانم دکتر فاطمه کرمی تهرانی که در تنگناهای علمی، راهنمایی‌های ایشان و در مشکلات اجرایی تدابیرشان راه‌گشای مصائب بودند، نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایم.

از استاد مشاورم جناب آقای دکتر مرتضی عطری به خاطر مساعدتهایشان قدردانی می‌کنم.

از زحمات جناب آقای دکتر محمود آقایی که در تمام مراحل اجرایی این پروژه نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر را دارم.

از آقای مجید سهرابی که در طول انجام این پایان‌نامه، از هیچ کمکی دریغ نکردند، صمیمانه سپاسگذاری می‌نمایم.

از خانم دکتر فرانک فلاحیان، آقایان دکتر نیما خرم‌آبادی و رامین سراوانی به سبب کمک و یاری‌شان قدردانی می‌کنم.

از مساعدت‌های بخش ویروس‌شناسی انستیتوپاستور ایران به ویژه خانم رزیتا عدالت و همچنین پرسنل بیمارستان بهمن و دی کمال تشکر را دارم.

چکیده

فسفودی‌استراز ۵ و ۹، آنزیم‌هایی هستند که مسئول تنظیم متابولیسم پیام رسان ثانویه از طریق عمل هیدرولیزی بر روی باند فسفودی‌استری ۵'،۳' نوکلئوتید حلقوی گوآنین منوفسفات هستند. میزان بیان ایزوفرم‌های مختلف فسفودی‌استرازها در برخی از سرطان‌ها تغییر می‌کند، زیرا نوکلئوتید حلقوی گوانین در تنظیم رشد، تکثیر و تمایز سلولی نقش مهی دارد. سرطان سینه شایع‌ترین علت مرگ و میر در بین سرطان‌های زنان است و همچنین بعد از سرطان ریه دارای رتبه دوم در میان تمام سرطان‌های انسانی را دارا می باشد.

مطالعه حاضر به بررسی میزان بیان ایزوآنزیم ۵ و ۹ فسفودی‌استراز در سرطان سینه می‌پردازد. بیست و پنج نمونه بافت سینه شامل پانزده نمونه بدخیم، پنج نمونه خوش‌خیم و پنج نمونه نرمال سینه از بیمارانی که تحت عمل جراحی تومور سینه قرار گرفته بودند، جمع‌آوری گردید.

میزان بیان این دو ایزوآنزیم با استفاده از تکنیک Real-time PCR بر پایه تکنولوژی TaqMan probe، اندازه‌گیری گردید. ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد و همچنین روش ΔΔCt برای محاسبه میزان بیان نسبی این دو ژن استفاده گردید.

نتایج بدست آمده به این صورت بود که میزان بیان نسبی فسفودی‌استراز ۵ و ۹ در بافت بدخیم سینه نسبت به بافت خوش‌خیم ونرمال بالاتر بود ($P < ۰/۰۰۱$). به طوری که در ایزوانزیم ۵ حدود ۵/۵ برابر و در ایزوآنزیم ۹ حدود ۶/۳ برابر افزایش بیان نشان دادند. این در حالی است که میان بیان این دو ایزوآنزیم (۵ و۹ فسفودی‌استراز) در بافت خوش‌خیم با بافت نرمال سینه تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید ($P > ۰/۵$ و $P > ۰/۶$). بر پایه دانش ما، مطالعه حاضر اولین تحقیقی است که افزایش بیان ایزوآنزیم ۵ و ۹ فسفودی‌استراز را در نمونه‌های توموری بدخیم سینه نسبت به نمونه‌های نرمال و خوش‌خیم سینه نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: ایزوآنزیم ۵و ۹ فسفودی‌استراز، سرطان سینه، Real-time PCR

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱. فسفودی‌استراز ۲

۱-۱-۱ .طبقه بندی فسفودی‌استراز ۳

۱-۱-۲. انواع ایزوآنزیم‌های فسفودی‌استراز ۴

۱-۱-۲-۱. ایزوآنزیم‌های دسته اول ۴

۱-۱-۲-۲. ایزوآنزیم‌های دسته دوم ۶

۱-۱-۲-۳. ایزوآنزیم‌های دسته سوم ۸

۱-۲. Cyclic GMP و سیگنالینگ درون سلولی ۸

۱-۲-۱. فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ cGMP ۸

۱-۲-۲. مهار مسیر سیگنالینگ cGMP ۱۱

۱-۳ .خصوصیات فسفودی‌استراز۵ ..... ۱۱

۱-۴.خصوصیات فسفودی‌استراز۹ ..... ۱۳

۱-۵. سرطان سینه ۱۴

۱-۵-۱. انواع سرطان سینه ۱۴

۱-۵-۲. مرحله بندی سرطان سینه ۱۵

۱-۵-۳. خصوصیات تومور خوش‌خیم و بدخیم ۱۵

۱-۵-۴. عوامل افزایش دهنده احتمال بروز سرطان سینه ۱۶

۱-۵-۵. تشخیص سرطان سینه ۱۷

۱-۶ . اصول Real-time PCR ۱۸

۱-۶-۱. رنگ‌های متصل شونده به DNA ۲۱

۱-۶-۲. Real-time PCR بر مبنای پرایمر ۲۴

۱-۶-۳. Real-time PCR بر مبنای پروب ۲۵

۱-۶-۴. ویژگی‌های شاخص Real-time PCR ۲۶

۱-۶- ۵. Quantification Real-time PCR ۲۷

۱-۶-۶. Relative Quantification ۲۹

۱-۷. مروری بر تحقیقات انجام گرفته ۳۰

۱-۸. فرضیه‌ها، اهداف وسیر منطقی تحقیق ۳۱
۱-۸-۱. فرضیه‌ها/ پیش فرض‌ها ۳۲
۱-۸-۲. اهداف تحقیق ۳۲
فصل دوم: مواد و روش‌ها ۳۳
۲-۱. شمایی کلی از روش انجام تحقیق ۳۴
۲-۲. نمونه‌گیری ۳۴
۲-۲-۱. آماده‌سازی نمونه ۳۵
۲-۳. استخراج RNA از نمونه‌های بافت سینه ۳۵
۲-۳-۱. مواد و وسایل مورد نیاز برای استخراج RNA ۳۶
۲-۳-۲. تعیین کیفیت و غلظت RNA استخراج شده ۳۸
۲-۴. واکنش RT-PCR یا سنتز cDNA ۳۸
۲-۴-۱. مواد و وسایل مورد نیاز برای سنتز cDNA ۳۹
۲-۵. واکنش PCR ۴۱
۲-۵-۱.طراحی پرایمر ۴۱
۲-۵-۲. آماده‌کردن پرایمرها ۴۲
۲-۵-۳. مواد و وسایل مورد نیاز برای انجام مراحل PCR ۴۲
۲-۵-۴. الکتروفورز ژل آگارز ۴۴
۲-۶. انجام مرحله Real-time PCR ۴۶
۲-۶-۱. مواد ووسایل مورد نیاز برای انجام Real-time PCR ۴۶
۲-۶-۲. نحوه تجزیه وتحلیل داده‌های Real-time PCR ۴۹
۲-۷. تحلیل آماری اطلاعات ۵۰
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۵۱
۳-۱. جمعیت مورد مطالعه ۵۲
۳-۲. تعیین کمیتRNA استخراج شده ۵۲
۳-۳. تعیین کمیت و کیفیت cDNA سنتز شده ۵۳
۳-۴. آزمایش Real-time PCR ۵۴
۳-۴-۱.رسم منحنی استاندارد ۵۵
۳-۴-۲. بررسی بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-time PCR ۵۷

۳-۴-۳. تأیید صحت واکنش PCR ۶۰
۳-۵. نتایج نهایی حاصل از واکنش Real-time PCR ۶۰
۳-۵-۱. نتایج بررسی ایزوآنزیم ۵ فسفودی‌استراز ۶۱
۳-۵-۱-۱. مقایسه نسبت بیان ژن PDE5 در بین دو گروه نرمال و بدخیم سینه ۶۱
۳-۵-۱-۲. مقایسه نسبت بیان ژن PDE5 در بین دو گروه نرمال و خوش‌خیم سینه ۶۲
۳-۵-۱-۳. مقایسه نسبت بیان ژن PDE5 در بین دو گروه خوش‌خیم و بدخیم سینه ۶۳
۳-۵-۲. نتایج بررسی ایزوآنزیم ۹ فسفودی‌استراز ۶۴
۳-۵-۲-۱. مقایسه نسبت بیان ژن PDE9 در بین دو گروه نرمال و بدخیم سینه ۶۴
۳-۵-۲-۲. مقایسه نسبت بیان ژن PDE9 در بین دو گروه نرمال و خوش‌خیم سینه ۶۴
۳-۵-۲-۳. مقایسه نسبت بیان ژن PDE9 در بین دو گروه خوش‌خیم و بدخیم سینه ۶۵
۳-۷. نتیجه کلی بدست آمده ۶۷
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۶۸
۴-۱. بحث ۶۹
۴-۲. پیشنهادها ۷۶
فهرست منابع ۷۷
واژه‌یاب ۸۶
چکیده‌ی انگلیسی ۹۱

فهرست جداول

جدول ۱-۱. ویژگی‌های رنگ‌های مرسوم مورد استفاده در Real-time PCR ۱۸

جدول ۱-۲. تعریف اصطلاحات مورد استفاده در Real-time PCR ۱۹

جدول ۲-۱.توالی پرایمرهای ژن Beta-actin در واکنش PCR ۴۱

جدول ۲-۲.مقدار مواد استفاده شده در واکنش سنتز cDNA ۴۳

جدول ۲-۳. مشخصات مواد خریداری شده از شرکت ABI ۴۶

جدول ۲-۴ خصوصیات کلی در مورد پرایمر طراحی شده برای ژن Beta-actin توسط شرکت ABI ۴۷

جدول ۲-۵ خصوصیات کلی در مورد پرایمر طراحی شده برای ژن PDE5 توسط شرکت ABI ۴۷

جدول ۲-۶ خصوصیات کلی در مورد پرایمر طراحی شده برای ژن PDE9 توسط شرکت ABI ۴۸

جدول ۳-۱. اطلاعات عددی بدست آمده از واکنش Real-time PCR بر روی پنج نمونه بافتی ۵۹

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. مقایسه میانگین بیان ژن PDE5 میان بافت نرمال و بدخیم سینه ۶۲

نمودار ۳-۲.مقایسه میانگین نسبی بیان ژن PDE5 میان بافت نرمال و خوش‌خیم سینه ۶۳

نمودار ۳-۳. مقایسه میانگین نسبی بیان ژن PDE5 میان بافت بدخیم و خوش‌خیم سینه ۶۴

نمودار ۳-۴. مقایسه نسبت بیان ژن PDE9 در بین دو گروه نرمال و بدخیم سینه ۶۵

نمودار ۳-۵. مقایسه میانگین نسبی بیان ژن PDE9 میان بافت نرمال و خوش‌خیم سینه ۶۶

نمودار ۳-۶.مقایسه میانگین نسبی بیان ژن PDE9 میان بافت بدخیم و خوش‌خیم سینه ۶۶

نمودار ۳-۷.بررسی کلی بیان PDE5 وPDE9 در بافت بدخیم و خوش‌خیم سینه نسبت به بافت نرمال ۶۷

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱ساختار شیمیایی نوکلئوتید حلقوی گوانین. ۳

شکل ۱-۲.ساختار ژنی مربوط به PDE1، PDE2 و PDE3. ..... ۵

شکل ۱-۳.ساختار ژنی مربوط به PDE4، PDE7، PDE8 ..... ۷

شکل ۱-۴.مسیر سیگنالینگ درون سلولی cGMP ۱۰

شکل ۱-۵.ساختار ژنی مربوط به PDE5 ..... ۱۲

شکل ۱-۶. ساختار ژنی مربوط به PDE9 ..... ۱۳

شکل ۱-۷. مراحل مختلف یک واکنش Real-time PCR. ۲۱

شکل ۱-۸. شمایی از تکنیک SYBR Green I ۲۲

شکل ۱-۹.منحنی ذوب ۲۳

شکل ۱-۱۰. Plexor system ۲۴

شکل ۱-۱۱. چگونگی عملکرد پروب TaqMan. ۲۶

شکل ۱-۱۲.منحنی استاندارد با پنج رقت لگاریتمی متوالی. ۲۸

شکل ۳-۱ نمونه‌ای از اطلاعات بدست آمده از cDNA سنتز شده به وسیله دستگاه نانودراپ. ۵۳

شکل ۳-۲. واکنش PCR مربوط به ژن Beta-actin نمونه‌های بافتی سینه. ۵۴

شکل ۳-۳ منحنی پیشرفت واکنش و منحنی استاندارد در چهار رقت مختلف مربوط به ژن Beta-actin. ۵۵

شکل ۳-۴.منحنی پیشرفت واکنش و منحنی استاندارد در چهار رقت مختلف مربوط به ژن.PDE5 ..... ۵۶

شکل ۳-۵. .منحنی پیشرفت واکنش و منحنی استاندارد در چهار رقت مختلف مربوط به ژن.PDE9 ..... ۵۶

شکل ۳-۶. .منحنی تکثیر واکنش مربوط به ژن Beta-actin برای پنج نمونه نرمال و توموری. ۵۷

شکل ۳-۷. منحنی تکثیر واکنش مربوط به ژن PDE5 و ژن PDE9 برای پنج نمونه نرمال و توموری ۵۸

شکل ۳-۸. الکتروفورز ژل آگارز برای محصول واکنش Real-time PCR ۶۱

Chapter 1 فصل اول

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۱. فسفودی‌استراز

فسفودی‌استرازها (EC = 3.1.4) گروهی از آنزیم‌هایی هستند که سطح داخل سلولی پیامبرهای ثانویه، نوکلئوتید حلقوی آدنین (cAMP[1]) و نوکلئوتید حلقوی گوانین (cGMP[2]) را تنظیم می‌کنند (شکل۱-۱).

این دسته از آنزیم‌ها در گروه هیدرولازها طبقه‌بندی می‌شوند . آنها باند فسفودی‌استری را در cAMP و cGMP با استفاده از آب تجزیه کرده و باعث ایجاد 5'AMP و 5'GMP می‌شوند [۲،۱].

$$cGMP + H_2O \longrightarrow GMP$$

$$cAMP + H_2O \longrightarrow AMP$$

cGMP و cAMP نوکلئوتیدهای حلقوی هستند که در بسیاری از سلولها به عنوان پیامبر ثانویه فعالیت می کنند، که باعث انتقال پیام درون سلول می‌شوند [۳].

فعالیت فسفودی‌استرازها برای سیگنالینگ درون سلولی دارای اهمیت زیادی است، زیرا متابولیسم نوکلئوتیدهای حلقوی موجب تنظیم غلظت درون سلولی آنها گردیده و در نتیجه بر روی پاسخ‌های سلولی آنها تاثیرگذار است، چرا که یکی از مهم‌ترین اصول سلولی این است که هر پیام سلولی، بعد از مدتی باید در سلول متوقف شود تا هموستاز سلولی کنترل شود.

فسفودی‌استرازها با این نوع فعالیت، باعث مهار پیام سیگنالینگ درون سلولی به واسطه عمل کاتالیتیکی بر روی نوکلئوتیدهای حلقوی می‌شوند [۵،۴].

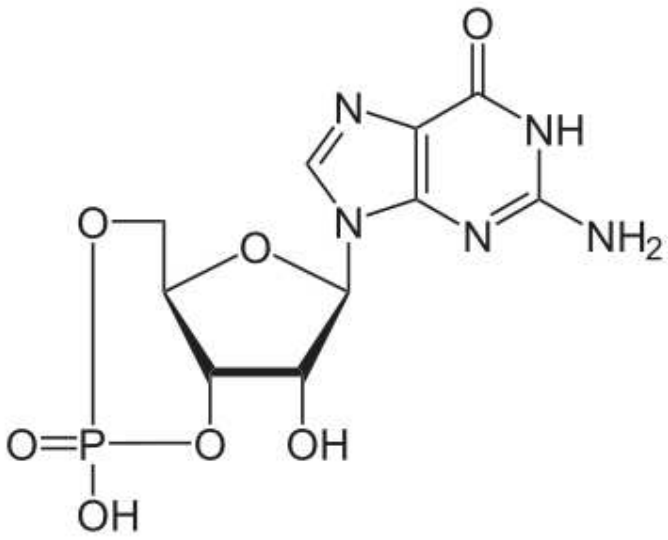
[1] Adenosine 3_5_-cyclic monophosphate
[2] Guanosine 3_5_-cyclic monophosphate

۱-۱-۱. طبقه‌بندی فسفودی‌استرازها

فسفودی‌استرازها (PDE[1]) به سه دسته I II III تقسیم می‌شوند. کلاس II شامل آنزیمهای موجود در قارچها و کاندیداآلبیکنس می‌باشد. این گروه دارای یک موتیف حفظ شده‌ای است که دارای سه هیستیدین است.

کلاس III در پروکاریوتها دیده می‌شود که بخش کاتالیتیکی آنها به واسطه فعالیت هیدرولازی به کمک آب، قابل قیاس با اسیدفسفاتاز است. این دسته ازنظر ساختمانی به عنوان عضوی از متالوفسفودی‌استرازها درنظر گرفته می‌شوند. فسفودی‌استرازهای پستانداران متعلق به دسته I می‌باشند. دارای دمین[2] کاتالیتیکی در نیمه C ترمینال می‌باشند و نیمه N ترمینال آنها درتنظیم فعالیت آنزیمی نقش دارد [۶].

در این کلاس ۲۱ ژن مسئول بیان انواع فسفودی‌استرازها می‌باشند. از این ۲۱ ژن ، ۱۱ خانواده مختلف فسفودی‌استراز شناسایی شده‌اند. این ۱۱ ایزوآنزیم متفاوت فسفودی‌استراز در طی عمل پردازش ژنی (splicing) به واریانت‌های متفاوتی تبدیل می‌شوند [۸،۷].



3', 5' Cyclic GMP (cGMP)

شکل۱-۱. ساختار شیمیایی نوکلئوتید حلقوی گوانین

[1] Phosphodiesterase
[2] Domain

۱-۱-۲. انواع ایزوآنزیم‌های فسفودی‌استرازها

فسفودی‌استرازها را بر اساس نوع سوبسترایی که هیدرولیز می‌کنند به ۱۱ ایزوآنزیم تقسیم بندی می‌شوند. گروه اول شامل ایزوآنزیم‌های نوع ۱، ۲، ۳، ۱۰ و ۱۱ که هم نوکلئوتید حلقوی آدنین و هم نوکلئوتید حلقوی گوانین را هیدرولیز می‌کنند. گروه دوم شامل ایزوآنزیم‌های نوع ۴، ۷ و ۸ که به طور اختصاصی مسئول هیدرولیز نوکلئوتید حلقوی آدنین می‌باشند و گروه سوم شامل ایزوآنزیم‌های نوع ۵، ۶، ۹ که به طور اختصاصی روی سوبسترای نوکلئوتید حلقوی گوانین عمل هیدرولیز را انجام می‌دهد [۹].

۱-۱-۲-۱. ایزوآنزیم‌های دسته اول

فسفودی‌استراز نوع ۱

سه ژن مسئول بیان ایزوآنزیم نوع ۱ می‌باشد (PDE1A-PDE1B-PDE1C). هر سه اینها دارای دمین اتصالی به کلسیم – کالمودلین در N- ترمینال می‌باشند [۱۱،۱۰]. انتشار بافتی این سه واریانت متفاوت است به طوری که PDE1A در عضلات صاف ، قلب، اسپرم و PDE1B در سلول‌های عصبی، لنفوسیت‌ها و PDE1C در ماکروفاژها و مغز هستند [۱۳،۱۲].

فسفودی‌استراز نوع ۲

تنها یک ژن مسئول کد کردن ایزوآنزیم نوع ۲ می‌باشد (PDE2A). این آنزیم دارای دو دمین اتصالی GAF [۱] (A-B) در N- ترمینال خود می‌باشد که دمین GAF-A به طور اختصاصی به نوکلئوتید حلقوی گوآنین متصل می‌شود و دمین GAF-B هم به نوکلئوتید حلقوی گوآنین و هم به نوکلئوتید حلقوی آدنین متصل می‌گردد [۱۵،۱۴]. ایزوآنزیم نوع ۲ بیشتر در غده فوق کلیه، پلاکت‌ها و سلول‌های اندوتلیال یافت می‌شود [۱۷،۱۶].

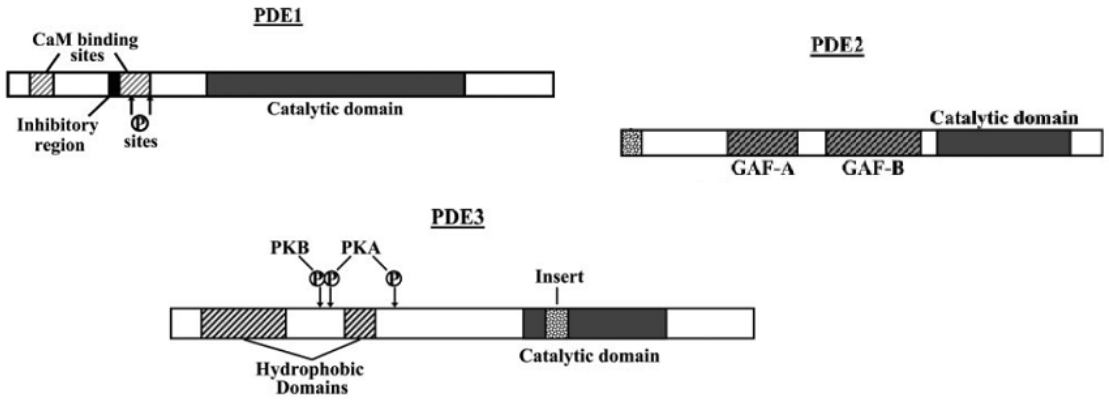
فسفودی‌استراز نوع ۳

ایزوآنزیم نوع ۳ توسط دو ژن کد می‌شود (PDE3A-PDE3B). این ایزوآنزیم دارای دمین اتصالی به

[1] GTpase accelerating protein

cGMP می‌باشد. اما میل اتصالی‌اش به cAMP در حدود ۱۰ برابر بیشتر از cGMP است [۱۸].

این ایزوآنزیم در قسمت N ترمینال خود علاوه بر دو دمین اتصالی، دارای سایتی است که با عمل فسفوریلاسیون توسط PKA[1] و PKB[2] تنظیم می‌گردد (شکل ۱-۲) [۱۹].



شکل ۱- ۲. ساختار ژنی مربوط به PDE1، PDE2، PDE3

واریانت A ایزوآنزیم ۳ فسفودی‌استراز بیشتر در بافت‌های قلبی، عضلات صاف و کلیه بیان می‌شود و واریانت B بیشتر در بافت آدیپوسیت، هپاتوسیت و هم چنین عضلات صاف انتشار بافتی دارد [۲۱،۲۰].

فسفودی‌استراز نوع ۱۰

تنها یک ژن مسئول بیان این ایزوآنزیم هست (PDE10A). این ایزوآنزیم دارای دو دمین برای اتصال به cAMP و cGMP در N ترمینال خود می‌باشد [۲۲]. البته میل اتصالی‌اش به cAMP حدود پنج برابر بیشتر از cGMP می‌باشد که به نوعی می‌توان گفت عکس فسفودی‌استراز ۳ می‌باشد [۲۴،۲۳]. این ایزوآنزیم طی عمل ویرایش به پنج واریانت مختلف تقسیم بندی می‌شود. ایزوآنزیم ۱۰ فسفودی‌استراز بیشتر در مغز، قلب و غده تیروئید یافت می‌گردد [۲۵] .

[1] cAMP-dependent protein kinase
[2] Protein kinase B