١١٤٩٥٢

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش ژنتیک

کلون کردن cDNA ایزوفرم PPARγ1 (Peroxisome proliferator activated receptor γ1) موش و ساخت پلاسمید بیانی PPARγ1 در حامل محتوی EGFP

استادان راهنما:

دکتر کامران قائدی

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

استاد مشاور:

دکتر ابوالقاسم اسماعیلی

پژوهشگر:

ثریا قاسمی

اسفند ماه ۱۳۸۷

۱۳۸۸/۴/۶

۱۱۴۹۵۲

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

هزینه های مصرفی انجام این پایان نامه بر مبنای قرارداد شماره ۸۶۳۲۷۱۱ پ.ر مورخ ۱۳۸۶/۱۲/۸ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

شیوه نگارش پایان نامه
رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم پایه

گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی گرایش ژنتیک خانم ثریا قاسمی تحت عنوان

کلون کردن cDNA ایزوفرم PPARγ1 (Peroxisome proliferator activated receptor γ1) موش و ساخت پلاسمید بیانی PPARγ1 در حامل محتوی EGFP

د ر تاریخ ۱۳۸۷/۱۲/۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر کامران قائدی	با مرتبه ی علمی استادیار	امضا
۲ - استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد حسین نصر اصفهانی	با مرتبه ی علمی دانشیار	امضا
۳- استاد مشاور پایان نامه	دکتر ابوالقاسم اسماعیلی	با مرتبه ی علمی استادیار	امضا
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر صادق ولیان بروجنی	با مرتبه ی علمی دانشیار	امضا
۵- استاد داور خارج از گروه	دکتر حمید میر محمد صادقی	با مرتبه ی علمی دانشیار	امضا

امضای مدیر گروه

خدایا

به من توانی عطا کن تا بر آنچه از دانش بخشیده ای شکر گزار باشم و به آنان که زوایای تیره اندیشه ام را با آموزگاری خویش روشن نموده اند اجر فراوان ده و مرا آن شایستگی عنایت فرما تا در بازمانده حیات خویش سزاوار دانش فزون تر از جانب تو باشم و عنایتی کن تا آموخته هایم بی سود نباشد و بتوانم به یاری علمی که مرا داده ای بنده ای شایسته برای تو و یاوری توانا برای بندگانت باشم.

تقدیم به عزیزانم

پدرم

مادرم

همسرم

برادرم

چکیده:

هدف تحقیق: کلون نمودن PPAR γ1 موش در پلاسمید بیانی pEGFP-C1 و بررسی جایگیری آن در هسته سلول مورد مطالعه (فیبروبلاست گاوی) با استفاده از رد یابی مارکر EGFP می باشد.

روش تحقیق: پس از استخراج RNA کل سلول از بافت چربی موش بالغ، cDNA مربوطه تهیه شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر *PPARγ1* cDNA صورت گرفت. *PEP* cDNA تکثیر شده پس از هضم آنزیمی در پلاسمید EGFP-C1 قرار گرفت. باکتری های One Shot TOP 10 با محصول اتصال پلاسمید و *PPARγ1* cDNA ترانسفورم گردیدند و پس ازکشت کلونی های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب با آزمون PCR انتخاب و تکثیر گردیدند و بر روی پلاسمید خالص شده ازآنها تست های هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. برای بررسی الگوی بیان و جهت گیری PPARγ1 با کمک مارکر EGFP درون سلول های فیبروبلاست گاوی ، این سلول ها با ۲،۴ µg پلاسمید و ۶ µl Lipofectamine 2000 ترانسفکت شدند.

نتایج: نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی ثابت کرد که قطعه تکثیر و کلون شده همان *PPARγ1* cDNA می باشد. cDNA این ژن شامل 1428 جفت باز می باشد. همچنین به دنبال ترانسفکت نمودن سلول های فیبروبلاست گاوی، پروتئین حاصله عمدتا وارد هسته ها گردید. همان طور که انتظار می رفت، cDNA ژن *PPARγ1* بدرستی کلون گردیده و عملکرد مثبت آن از طریق جهت یابی به داخل هسته سلولهای مورد مطالعه، به اثبات رسید.

کلمات کلیدی: PPARγ1، پلاسمید، فیبروبلاست، کلونینگ

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱پراکسیزوم ها ۱

۱-۲گیرنده های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم ها (PPARs) ۳

۱-۳ایزوتیپ های PPAR در انسان ۴

۱-۴ اساس مولکولی ویژگی های PPAR ۶

۱-۵ مکانیسم مولکولی انتقال به هسته ۸

۱-۶ تنظیم عملکرد PPAR بوسیله تغییرات پس از ترجمه ۱۰

۱-۶-۱ تغییرات پس از ترجمه شامل فسفریلاسیون، یوبی کوئیتینه شدن، Sumoylation هستند ۱۰

۱-۶-۲تنظیم فضایی تخریب پروتئین ۱۱

۱-۷ تنظیم بیان ژن توسط PPAR ۱۱

۱-۸ اتصال مهارکنندگان همراه و مهار رونویسی ۱۳

۱-۹ اساس مولکولی PPARγ در موش ۱۳

۱-۱۰ PPARγ و هنجارهای وابسته به آن ۱۴

۱-۱۱بیان PPARγ در زمان جنینی ۱۷

۱-۱۲ ارتباط PPARγ با سرطان ۱۷

۱-۱۳ تکنیک کلون نمودن cDNA ژن ۱۸

۱-۱۴ تکنیک SOE- PCR ۱۸

۱-۱۵تکنیک ترانسفکشن DNA ۱۹

۱-۱۵-۱ تکنیک ترانسفکشن گذرا و پایدار ۲۱

۱-۱۶ فیبروبلاست ۲۱

۱-۱۷ هدف از این پژوهش ۲۲

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱ تجهیزات و دستگاه ها ۲۳

عنوان | صفحه

۲-۲ مواد مصرفی و نحوه ساخت ۲۴
۲-۲-۱ سویه های باکتری ۲۴
۲-۲-۲ وکتور ۲۴
۲-۲-۳ محیطهای کشت ۲۶
۲-۲-۳-۱ محیط کشت باکتریایی 2YT و LB ۲۶
۲-۲-۴ تهیه سلول های باکتریایی مستعد برای ترانسفورماسیون ۲۷
۲-۲-۵ آنتی بیوتیک ۲۸
۲-۲-۶ محیط کشت سلول های فیبروبلاست گاوی ۲۸
۲-۲-۷ مواد مورد نیاز الکتروفورز ۳۰
۲-۲-۷-۱ بافر الکتروفورز 50X TAE ۳۰
۲-۲-۷-۲ اتیدیوم بروماید ۳۰
۲-۲-۷-۳ لودینگ بافر ۳۱
۲-۲-۷-۴ شناساگرهای اندازه DNA ۳۱
۲-۲-۸ مواد مورد نیاز تکنیک PCR ۳۲
۲-۲-۸-۱ طراحی پایمر ۳۲
۲-۲-۸-۲ سایر مواد مورد نیاز برای PCR ۳۳
۲-۳ روش ها و تکنیک ها ۳۵
۲-۳-۱ کلون نمودن PPAR γ1 - cDNA ۳۵
۲-۳-۱-۱استخراج total RNA ۳۵
۲-۳-۱-۲ روش الکتروفورز ۳۷
۲-۳-۱-۳سنتز cDNA ۳۷
۲-۳-۱-۳-۱ آماده سازی RNA ۳۷
۲-۳-۱-۳-۲ سنتزcDNA ۳۸
۲-۳-۱-۴ تکثیر یک ژن خانه گردان از روی cDNA ساخته شده ۳۹
۲-۳-۱-۵ روش انجام تکنیک PCR ۳۹
۲-۳-۲ ساخت و تکثیر PPARγ1 cDNA به روش SOE-PCR ۴۰

عنوان | صفحه

۲-۳-۳ استخراج محصول PCR از ژل ۴۱
۲-۳-۳-۱ روش استخراج وخالص سازی نمونه های DNA از ژل ۴۱
۲-۳-۴تعیین غلظت DNA ۴۲
۲-۳-۵ انبوه سازی قطعه PPARγ1cDNA با وارد کردن آن در pTZ57R/T و ترانسفورماسیون سازه ۴۲
۲-۳-۶ الحاق ۴۲
۲-۳- ۷ ترانسفورماسیون ۴۳
۲-۳-۸ نحوه ساخت X-gal و IPTG ۴۴
۲-۳-۹ کلونی PCR جهت Insert check ۴۴
۲-۳-۱۰ استخراج پلاسمید ۴۵
۲-۳-۱۱ PCR بر روی وکتورهای استخراج شده ۴۶
۲-۳-۱۲ تعیین توالی ۴۶
۲-۳-۱۳-۱ تکثیر و استخراج پلاسمید pEGFP-C1 ..... ۴۷
۲-۳-۱۳-۲ هضم آنزیمی ۴۷
۲-۳-۱۳-۳ تخلیص و رسوب نمونه DNA به روش فنل- کلروفرم ۴۸
۲-۳-۱۳-۴ تخلیص محصولات دو بار برش یافته ۵۰
۲-۳-۱۳-۵ وارد نمودن قطعه cDNA تخلیص شده به پلاسمید بیانی pEGFP-C1 ..... ۵۰
۲-۳-۱۳-۶ کلونی PCR جهت Insert check و استخراج پلاسمید ۵۰
۲-۳-۱۳-۷ PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده ۵۱
۲-۳-۱۴ ردیابی بیان وکتور*pEGFP-C1 -PPARγ1 cDNA* در سلول های فیبروبلاست ۵۱
۲-۳-۱۴-۱ ذوب سلول های فیبروبلاست ۵۱
۲-۳-۱۴-۲ پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن ۵۲
۲-۳-۱۴-۳ ترانسفکشن ۵۳
۲-۳-۱۴-۴ آماده سازی سلول ها برای مشاهده ۵۴

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱ کلونینگ PPARγ1-Cdna ۵۵
۳-۱-۱ نتیجه استخراج RNA از بافت چربی موش سوری ۵۵

عنوان | صفحه

۳-۱-۲ نتیجه سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده از بافت چربی موش سوری ۵۶
۳-۱-۳ نتیجه سنتز ۲ قطعه از روی cDNA به عنوان الگو برای انجام مرحله نهایی SOE-PCR ۵۷
۳-۱-۳-۱ نتایج PCR برای سنتز دو قطعه دارای همپوشانی ۵۷
۳-۱-۳-۲ نتیجه استخراج از ژل قطعات اول و دوم ۵۷
۳-۱-۴ نتیجه سنتز قطعه کامل PPARγ... ..... ۵۷
۳-۱-۵ نتیجه انبوه سازی ۶۰
۳-۱-۶ نتیجه بررسی جدا سازی کلنی های سفید دارای پلاسمید PPARγ1cDNA- pTZ57R/T ۶۱
۳-۱-۷ نتیجه استخراج پلاسمید .pTZ57R/T ۶۳
۳-۱-۸ نتایج بررسی توالی قطعه درون پلاسمید ۶۴
۳-۱-۹ نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T ۶۶
۳-۱-۱۰ نتایج تخلیص محصولات دو بار برش یافته ۶۷
۳-۱-۱۱ تکنیک الحاق ۶۸
۳-۱-۱۲ ترانسفورماسیون پلاسمید pEGFP-C1 ..... ۶۸
۳-۱-۱۳ نتیجه Insert check PCR برای اثبات ورود قطعه به درون وکتور بیانی ۶۹
۳-۱-۱۴ نتایج استخراج پلاسمید PPARγ1 ..... ۷۰
۳-۲ ردیابی جایگاه درون سلولی پروتئین PPARγ1 ..... ۷۱
۳-۲-۱ نتایج ذوب سلول های فیبروبلاست گاوی ۷۲
۳-۲-۲ نتایج پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن ۷۳
۳-۲-۳ نتایج ترانسفکشن ۷۳
۳-۲-۴ نتایج ردیابی مارکر فلورسانتی در سلول های فیبروبلاستی ترانسفکت شده ۷۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱ بحث ۷۴
۴-۲ نتیجه گیری کلی ۷۸
۴ -۳ پیشنهادات ۷۸
منابع و ماخذ: ۷۹

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل۱- ۱: PPARs پس از فعال شدن توسط لیگاندها (مشتقات اسیدهای چرب)، فعال می شوند. ۷

شکل ۱-۲: دومین ها و مناطق حفظ شده در تمامی ایزوتیپ های PPARs ۸

شکل ۱- ۳: توالی PPRE ۸

شکل ۱- ۴ طرحی شماتیک از انجام SOE-PCR ۱۹

شکل ۱- ۵: نمای شماتیک ترانسفکشن با استفاده از لیپوزوم‌های کاتیونی ۲۱

شکل۱-۶: سلولهای فیبروبلاست ۲۲

شکل ۲- ۱: نقشه ژنتیکی وکتور بیانی pEGFP-C1 ..... ۲۵

شکل ۲-۲: نقشه ژنتیکی وکتورpTZ57R/T ۲۶

شکل ۲-۳: دو نوع شناساگر مورد استفاده برای اندازه گیری طول باندها ۳۱

شکل ۳- ۱ : استخراجRNA از بافت چربی موش سوری ۵۶

شکل ۳-۲ قطعات حاصل از PCR ۵۹

شکل ۳-۳: قطعه کامل پس از سنتز شدن از روی ژل بریده شد و خالص سازی شد. ۵۹

شکل ۳- ۴: کلونی های سفید ۶۱

شکل ۳-۵: باند مشاهده شده نشانه ورود قطعه ۶۲

شکل ۳- ۶: استخراج پلاسمیدها ۶۳

شکل ۳-۷: ترادف *PPARγ1*-cDNA ۶۴

شکل۳-۸: هضم آنزیمی پلاسمیدها ۶۷

شکل ۳-۹: خالص سازی محصولات حاصل از هضم آنزیمی با دو آنزیم *Sac*I و *Kpn*I ۶۸

شکل۳-۱۰:انکوبه کردن محیط های کشت انتخابی دارای آنتی بیوتیک کانامایسین پس از ۶۹

شکل ۳-۱۱ نتیجه کلونی PCR پس از ترانسفورماسیون با پلاسمید ۶۹

شکل۳-۱۲هضم پلاسمید pEGFP-C1/ PPARγ1 توسط دو آنزیم *Sac*I و *Kpn*I ۷۰

شکل۳-۱۳ طرحی شماتیک از کلیه مراحل تکثیر و کلون نمودن قطعه مورد نظر در پلاسمید بیانی ۷۱

شکل ۳-۱۴ نتایج مشاهده شدن سلول های ترانسفکت شده با استفاده ازEGFP به عنوان ردیاب ۷۳

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱: دستگاه های مورد نیاز ۲۳

جدول ۲-۲: فرمول محیط کشت YT۲ برای محیط جامد ۲۶

جدول ۲- ۳: فرمول محیط کشت LB مایع ۲۷

جدول ۲- ۴: غلظت آنتی بیوتیکها برای انتخاب سوش های مقاوم ۲۸

جدول ۲- ۵ محیط کشت سلول های فیبروبلاست گاو ۲۹

جدول ۲- ۶: فرمول محیط DMEM ۲۹

جدول ۲- ۷: پرایمرهای طراحی شده ۳۲

جدول۲-۸: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز Pfu در حجم ۲۵ میکرولیتر ۳۳

جدول۲-۹: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز SmartTag در حجم ۱۵ ... ۳۳

جدول۲-۱۰: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز SmartTag ۳۴

جدول۲-۱۱: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR با استفاده از آنزیم پلیمراز EX-Tag ۳۴

جدول ۲-۱۲: ترکیبات QIAquick Gel Extraction Kit ۴۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱ پراکسیزوم ها[1]

پراکسیزوم ها، اندامک های یوکاریوتی تک غشائی هستند که دارای عملکردهای متنوع می‌باشند. این اندامک ها مکانیسم‌های بیوژنتیکی مشابهی دارند و در ابتدا (۱۹۵٤) از طریق مورفولوژیک تشخیص داده شدند و سپس (در سال ۱۹٦۵) عملکرد آن ها بررسی شد. در سال ۱۹۵٤، Johannes Rhodin، در سلول های کلیه موش، ارگانل های کوچکی در حد ۰/۵ میکرومتر را شناسایی و آن ها را میکروبادی نامید. در سال ۱۹٦۵، Christian de Duve فعالیت پراکسیداسیونی این میکروبادی ها را شناسایی کرد و نام پراکسیزوم را برای ساختارهای فوق پیشنهاد کرد. پراکسیزوم ها مکانیسم پیدایش مشترکی دارند و عملکرد آنها بسته به بافت، مرحله رشد و شرایط محیطی متفاوت است. انواع مختلف پراکسیزوم ها می توانند در اثر سنتز و ورود آنزیم های جدید به هم تبدیل شوند. برخی فعالیت ها نظیر، بتااکسیداسیون اسیدهای چرب و متابولیسم گونه‌های واکنشگر اکسیژن[2] در همه انواع پراکسیزوم مشترک است (۱،۲).

---

[1] Peroxisomes

[2]. Reactive oxygen species

این اندامک ها از جمله اندامک های تک غشایی تمام سلول های یوکاریوتی، بجز آرکوزوآها هستند. معمولاً پراکسیزوم ها حاوی ماتریکسی هستند که درون آن پروتئین های محلول در آب وجود دارد. پراکسیزوم ها دارای آنزیم های متنوعی هستند که این آنزیم ها شامل کاتالاز، آنزیم‌های دخیل در β اکسیداسیون اسیدهای چرب بسیار طویل، همچنین آنزیم هایی که در سنتز پلاسمالوژن ها نقش دارند، می‌باشند. پراکسیزوم ها درمراحل مختلف اکسیداسیون اسیدهای آمینه D و L، اسیداوریک، الکل ها، پلی‌آمین، α هیدروکسی‌اسیدها، دی‌کربوکسیلیک اسیدها و پیپکولیک اسیدها، گلی‌اکسالات و پروستاگلاندین‌ها همچنین در بیوسنتز کلسترول، گلیسرولیپیدها و اسیدهای صفراوی نقش دارند (۳).

پراکسیزوم 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 پراکسیزومی عبارتند از:

۱. پراکسیزوم 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 آمینه L و D، پلی‌آمین‌ها، متانول، اورات، گزانتین و اسیدهای چرب بسیار زنجیر بلند، به عنوان سوبستراهای مختلفی برای اکسیدازها به کار می‌روند. سیستم کاتالاز- فلاوین اکسیداز، ۲۰٪ اکسیژن مصرفی بافت های کبدی را شامل می‌شود. بنابراین، پراکسیزوم ها در تنظیم فشار اکسیژن سلول، ممکن است مهم باشند.

۲. پراکسیزوم ها در اکسیداسیون اسیدهای چرب نقش دارند:

اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری رخ می‌دهد. اما اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیره (زنجیرهای دارای بیش از ۲٤ کربن) به طور مؤثری توسط میتوکندری انجام نمی‌گیرد. از آنجایی که پراکسیزوم دارای آنزیم‌های بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب است قسمت اعظم اسیدهای چرب بلند زنجیره در پراکسیزوم ها اکسید می‌شود.

۲. در حیوانات، علاوه بر تجزیه لیپیدها، پراکسیزوم ها در سنتز برخی لیپیدها مثل پلاسمالوژن، کلسترول و اسیدهای صفراوی نیز نقش دارند (۳).

۱-۲ گیرنده های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم ها[3] (PPARs)

گیرنده های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم ها، فاکتورهای رونویسی فعال شونده توسط لیگاند هستند که متعلق به خانواده گیرنده های هسته ای هستند (۴). این گیرنده ها نخستین بار در سال ۱۹۹۰، از سلول های کبد موش تخلیص شدند. اولین نقشی که برای این گیرنده ها شناسایی شد، افزایش تعداد پراکسیزوم ها در سلول بود. با مطالعات بعدی مشخص شد که این گیرنده ها عملکردهای گسترده تری دارند و در فرایندهای مختلف سلولی، مثل رشد و تمایز سلول ها، مرگ سلولی (آپوپتوز)، تنظیم پاسخ ایمنی و تعادل انرژی نقش دارند. توزیع PPARsدر بافت های مختلف، متفاوت است و هر یک به لیگاندهای ویژه ای متصل می شود. همان طور که در شکل ۱- ۱ دیده می شود، این لیگاندها شامل اسیدهای چرب اشباع نشده و مشتقات آن ها مانند پروستاگلاندین ها و لکوترین ها هستند (۵). سه نوع PPAR (γوβ/δ،α)، در انواعی از موجودات شناخته شده است، در وزغ، موش، رت، هامستر و انسان که هر کدام با ژن های متفاوتی کد می شوند و الگوهای توزیع متفاوتی را نشان می دهند (۸،۷،۶). تغییر در تعادل (هومئوستاز) اسیدهای چرب یکی از دلایل ایجاد بیماری هایی نظیر دیابت، چاقی، سرطان و بیماری های قلبی- عروقی است. ابتدا تصور می شد که اسیدهای چرب اثر خود را از طریق تغییر در ترکیب غشا و یا تاثیر بر جریان انتقال پیام اعمال می کنند، ولی طی مطالعات بعدی مشخص شد که اسیدهای چرب با اتصال به گیرنده های هسته ای محلول با تنظیم بیان ژن ها اثر خود را اعمال می کنند. با استفاده از آزمایش نورترن بلات[4]، مشخص شده است که، PPARγ های موشی در بافت چربی، کبد، کلیه و قلب به میزان زیاد و در شش، بیضه ها، مغز، ماهیچه اسکلتی به میزان کمی بیان می شوند (۹،۱۰). بیان این ژن در انسان در بافت چربی و روده بزرگ به میزان بالا، در کبد، کلیه و روده کوچک در حد متوسط و در ماهیچه به میزان کم صورت می گیرد (۹،۱۱). اخیراً مشخص شده است، با وجود بیان کم PPARγ ها در مغز موش بالغ، در مغز جنین موش و سلول های بنیادی عصبی[5] بیان بالایی دارد (۱۲). همچنین، PPARγ ها در تنظیم تمایز ماکروفاژها، نقش دارد. آگونیست های طبیعی و سنتتیک PPARγ ممکن است، توسط بازداشتن چندین عملکرد مربوط به فعالیت میکروگلیالی (مهمترین جمعیت ماکروفاژی CNS)، همچون بیان آنتی ژن های سطحی، سنتز نیتریک اکسید، پروستاگلاندین ها، سیتوکین های التهابی و شیموکین ها، از التهاب مغزی جلوگیری کنند (۱۳). بنابراین آگونیست های مختلف PPARγ که قادر به جلوگیری از فعالیت این سلول های

---

[3] Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)
[4] Northern blot
[5] Neural stem cells (NSCs)

ایمنی می گردند، می توانند برای درمان بیماری های نورودژنراتیو همچون MS[6]، بیماری های آلزایمر، پارکینسون و غیره هدف داروهای درمانی باشد (۱۳،۱۴). با کشف جهش های جدید در ژن این گیرنده و ناهنجاری های مربوط به آن ها، همچون دیابت، چاقی، لیپودیستروفی و حتی سرطان هایی همچون سرطان کلون و دیگربافت ها، نقش های فراوان و اهمیت این ژن، بیشتر روشن می شود (۱۵،۱۶،۱۷،۱۸). نقش اصلی این گیرنده ها در ارتباط با سوخت و ساز سلولی (کربوهیدرات، چربی، پروتئین) و تمایز سلولی می باشد (۱۳). PPARγبه علاوه ، نقش مهمی در حساسیت به انسولین[7] ، همئوستازی بافتی[8] ، تنظیم عملکردهای سلولی و تمایز برعهده دارد (۱۲). PPARs با اتصال به اسیدهای چرب، بیان ژن ها را تنظیم و سرنوشت سلول را تعیین می کنند (۵).

۱-۳ ایزوتیپ های PPAR در انسان

PPARα: ژن رمزگذار PPARα در انسان بر روی کروموزوم ۲۲ قرار گرفته است. PPARα، اولین عضو شناخته شده از این گیرنده هاست. این گیرنده اساساً در بافت هایی که نرخ بالایی از بتا-اکسیداسیون را نشان می دهند، همچون کبد، کلیه، قلب و ماهیچه بیان زیادی دارد (۷). این گیرنده در جوندگان پاسخ به محدوده وسیعی از مواد شیمیایی که تکثیر کنندگان پراکسیزوم، نامیده می شوند را، میانجیگری می کند. این مواد شامل داروهای کاهش دهنده چربی خون[9] ،plasticizers ، اسیدهای چرب سنتز شده هستند (۱۹). تکثیر کنندگان پراکسیزوم تعداد و اندازه پراکسیزوم ها را افزایش می دهند و باعث هپاتومگالی شدیدی در گونه هایی از جوندگان مستعد می شوند. ژن های هدف PPARα، پروتئین هایی همچون (CYP4A1، CYP4A3، bifunctional enzyme و thiolase)، را کد می کنند که در بتا اکسیداسیون میتوکندری و پراکسیزومی، نقش دارند. انتقال دهندگان اسید چرب، اسید چرب سنتاز، پروتئین متصل شونده به اسید چرب کبدی[10] و آپولیپوپروتئین ها، این حدس را بوجود می آورند که PPARα، نقش مهمی در متابولیسم چربی و ترانسپورت دارند (۱۹،۲۰،۲۱،۲۲). این ژن عمدتا در سلول های تجزیه کننده اسیدهای چرب، مثل سلول های قلب، ماهیچه و کبد بیان می شود و کاتابولیسم اسیدهای چرب را تنظیم می کند. اکسیداسیون اسیدهای چرب از راه مسیر β-اکسیداسیون در میتوکندری و پراکسیزوم و ω-اکسیداسیون در میکروزوم انجام می گیرد. PPARα از راه

---

[6] Multiple Sclerosis
[7] Insulin sensitivity
[8] Tissue homeostasis
[9] Hypolipidemic
[10] Liver fatty acid-binding protein

افزایش بیان پروتئین های ناقل و آنزیم های تجزیه کننده اسیدهای چرب، سبب کاتابولیسم این مولکول ها می شود. قوی ترین آگونیست های این گیرنده اسیدهای چرب اشباع نشده با زنجیره های بلند و ضعیف ترین آن ها اسیدهای چرب اشباع شده با زنجیره های کوتاه هستند. لکوترین B4 (LTB4)، از مشتقات آراشیدونیک اسید، آگونیست PPARα است که خاصیت کموتاکسی دارد و این نشان دهنده نقش این گیرنده در تنظیم التهاب است (۲۵,۲۴,۲۳).

PPARβ/δ: ژن رمزگذار PPARβ/δ بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارد. محصول این ژن از سایر ایزوتیپ های این خانواده ناشناخته تر است. تعیین عملکرد خاص برای این گیرنده، به دلیل بیان آن در بافت های متعددی مثل قلب، ماهیچه، مغز، شش و طحال، مشکل است. از آنجا که جهش در این ژن کشنده است، دانشمندان هنوز موفق به تولید موش های Knock-out در این گیرنده نشده اند. همین موضوع نشان دهنده اهمیت PPARβ/δ در کاشت جنین و مراحل اولیه تکامل آن است. همچنین این گیرنده در ذخیره چربی ها، کاهش تری گلیسریدها در سرم و افزایش لیپوپروتئین های دارای چگالی بالا (HDL) نقش دارد. آگونیست های PPARβ/δ مشابه آگونیست های PPARα و شامل اسیدهای چرب اشباع شده و اشباع نشده هستند. علاوه بر این، PPARβ/δ قادر است با اتصال به انواع مختلفی از ایکوزانوئیدها، مثل پروستاگلاندین A1 (PGA1) و پروستاگلاندین D2 (PGD2) فعال شود و بیان ژن ها را تنظیم کند (۲۶,۲۴,۲۳).

PPARγ: ژن رمزگذار PPARγ در انسان بر روی کروموزوم۳ قرار گرفته است. PPARγ تنها در برخی بافت ها، مانند بافت چربی و سلول های سیستم ایمنی، بیان می شود. این گیرنده میزان قند خون و متابولیسم و ذخیره چربی را تنظیم می کند. در روند پیشنهادی، آگونیست های PPARγ با تحریک بافت چربی برای جذب اسیدهای چرب، باعث کاهش دسترسی ماهیچه های اسکلتی به این مولکول ها می شوند. در نتیجه، مصرف گلوکز توسط ماهیچه های اسکلتی افزایش می یابد و میزان قند خون تنظیم می شود. با وجود این، میزان قند خون در موش هایی که بافت چربی خود را از دست داده اند، در پاسخ به آگونیست های PPARγ کاهش می یابد و این یافته بیانگر حضور روند دیگری در تنظیم قند خون است. لیگاندهای PPARγ، شامل اسیدهای چرب غیر اشباع مثل آلفا- لینولئیک اسید و آراشیدونیک اسید است. PPARγ در تمایز سلول چربی(۲۷)، حساسیت به انسولین (۲۸)، شکل گیری سلول ماکروفاژ دهانی (۲۹) و میانجیگری در هایپرتروفی سلول چربی القا شده با چربی زیاد نقش دارد (۳۰). لیگاندهای PPARγ، شامل حساس کنندگان سنتتیکی به انسولین، ترکیبات تیازولیدیندیونی همچون rosiglitazone وtroglitazone در درمان دیابت های نوع دوم در انسان نقش

دارند. PPARγ ها، در انسان و موش توسط تیازولیدیندیون ها[11] و پروستاگلاندین J، فعال می شوند (۳۲,۳۱). همچنین، HODE[12] و 15d-PGJ2[13] لیگاندهایی هستند که PPARγ را با شدت بیشتری تحریک می کنند (۳۳,۲۴,۲۳).

۱-۴ اساس مولکولی ویژگی های PPARs

ایزوتیپ های PPAR ساختار مشابهی دارند که از ۵ ناحیه تشکیل شده است. مطابق با طرح شماتیکی که در شکل ۱-۲ مشاهده می شود، شباهت[14] زیادی بین این نواحی وجود دارد. در پایانه آمین این گیرنده ناحیه A/B قرار گرفته که خاصیت ترانس اکتیواسیون مستقل از لیگاند دارد. این ناحیه در غیاب لیگاند، توسط آنزیم MAP- کیناز فسفریله و فعال می شود و بیان ژن را تنظیم می کند. ناحیه C از دو رشته، حاوی انگشت روی، تشکیل شده که باعث اتصال گیرنده به توالی DNA می شوند. ناحیه D، ناحیه لولاست و در مجاورت آن، ناحیه E قرار گرفته که محل اتصال لیگاند است. ناحیه E از یک محفظه بزرگ آب گریز تشکیل شده، به طوری که لیگاند فقط ۳۰ تا ۴۰ درصد از فضای آن را اشغال می کند. این اندازه بزرگ به مولکول PPAR اجازه می دهد به لیگاندهای آب گریز متعددی متصل شود. ناحیه F در پایانه کربوکسیل قرار گرفته و خاصیت ترانس اکتیواسیون وابسته به لیگاند دارد. بر اثر اتصال لیگاند به گیرنده، ساختار این ناحیه تغییر می کند و در نتیجه، قادر است با کوفاکتور دخیل در فرایند رونویسی واکنش دهد. علاوه بر این، ناحیه F محل دو تا شدن (دایمریزاسیون) گیرنده با گیرنده رتینوئیک اسید (RXR) است (۲۴و۳۴). همچون بیشتر گیرنده های هسته ای، PPARs شامل چهار دومین عملکردی مجزا شامل، AF1 ، DBD[15]، لولا[16] و AF2 در سمت آمینی هستند. AF1 یک دومین فعال شونده وابسته به لیگاند است در حالی که فعالیت های AF2 به صورت یک رونویسی وابسته به لیگاند است و شامل دومین اتصال به لیگاند[17] است. DBD منطقه ای است که در بین ایزوفرم های گیرنده حفاظت شدگی بالایی دارد و شامل دو انگشت روی می باشد. PPARs به ژن های هدفشان توسط تشکیل یک هترودایمر از طریق DBD و گیرنده X رتینوئیدی (RXR) متصل می شوند (۳۴). PPAR نمی تواند به تنهایی به پروموتور

---

[11] Thiazolidinediones
[12] 13-Hydroxy octadecadioneic acid
[13] 15-deoxy-prostaglandin J2
[14] homology
[15] DNA binding domain
[16] hinge
[17] Ligand binding domain(LBD)