بسم الله الرحمن الرحيم

١١٠٧٠٧

۸۷/۱۱/۰۷۲۶۵
۸۷/۱۲/۲۱

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ی ژنتیک

کلون نمودن ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی

استاد راهنما:
دکتر صادق ولیان بروجنی

استاد مشاور:
دکتر کامران قائدی

پژوهشگر:
حامد اولنج

۱۳۸۷/۱۲/۱۳

آبان ماه ۱۳۸۷

۱۱۰۷۰۷

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

شیوه نگارش پایان نامه رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش ژنتیک آقای حامد اولنج

تحت عنوان

کلون نمودن ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی

در تاریخ ۸۷/۸/۱۲ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه دکتر صادق ولیان بروجنی با مرتبه‌ی علمی دانشیار — امضا

۲- استاد مشاور پایان‌نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۴- استاد داور خارج از گروه دکتر معراج پورحسین با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

امضای مدیر گروه

تقدیم به پدر بزرگوارم که در تمامی لحظه های زندگی مرا یاری نمود.

تقدیم به روح بلند مادر عزیزم که برایم چون سنگ صبور بود.

تقدیم به برادران مهربانم که درس فداکاری را به من آموختند.

به پاس آموخته ها و آنچه که سخن را توان قدردانی از آن نیست و به پاس چشیدن جرعه ای از سرچشمه بیکران دانش و با تقدیم احترام قلبی به تمام آنانکه در راه اعتلای دانش انسانی در کوره راه های تاریک تجربه و آزمایش گرانقدر ترین گوهر های وجود خویش را به قمار نهادند، این رساله تقدیم می شود به تمام آموزگاران و اساتیدم در دوران آموزش به ویژه اساتید محترم

جناب آقای دکتر صادق ولیان بروجنی

جناب آقای دکتر کامران قائدی

امیدوارم همواره با تکیه بر ارزشها از حماقتها فاصله جسته و آهنگ سفر را با بهترین اندیشه ها استوار بدارم.

پیشرفت و سعادت حقیقی زمانی تحقق می یابد که شناخت و انگیزه با خودباوری و اراده عجین شده و در اوج قرار گیرند.

حامد اولیج

چکیده

فنیل کتونوری یا PKU یک بیماری ژنتیکی ناشی از نقص در مسیر متابولیسمی یک اسیدآمینه ضروری به نام فنیل آلانین می باشد. این بیماری بصورت اتوزومی مغلوب به ارث می رسد. در این بیماران، آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) قادر نخواهد بود اسید آمینه ال- فنیل آلانین (L-Phe) را به ال- تیروزین (L-Try) تبدیل کند لذا مقدار L-Phe در خون و ادرار بالا می رود. تجمع فنیل آلانین در بدن منجر به تولید حد واسط های سمی شده که درصورت عدم درمان باعث عقب افتادگی ذهنی می شود.

ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی (hPAH) فاقد توالی پروموتوری TATA می باشد بطوریکه به آن TATA-less promoter می گویند ولی با وجود این دارای فاکتورهای رونوشت برداری متعددی برای شروع رونویسی می باشد. با استفاده از مدل موش های ترانس ژنتیک یک قطعه ۹ کیلوبازی در ناحیه '۵ در بالا دست ژن به عنوان پروموتر فرضی آن شناسایی شده است. به نظر می رسد این ناحیه دارای عناصر کافی و لازم cis-elements برای بیان اختصاصی فنیل آلانین هیدروکسیلاز در شرایط in vivo باشد. این قطعه ۹ کیلو بازی توسط فاکتورهای رونوشت برداری متعددی از جمله یک پروتئین اختصاصی به نام فاکتور هسته ای کبدی شماره یک (Hepatic Nuclear factor-1) رونوشت برداری می شود. مشخص شده است که این فاکتور رونوشت برداری به تنهایی قادر به بیان ژن های کبدی نبوده و فاکتورهای دیگری در بیان ژن *hPAH* دخیل هستند.

در این پژوهش ناحیه ۶۷۰ بازی از بالادست ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی به منظور دستیابی به توالی پروموتری، شناسایی نحوه بیان آنزیم، عوامل و فاکتورهای موثر در بیان ژن، بررسی ناحیه پروکسیمال پروموتر *PAH* و شناسایی عناصر سیس موجود در آن کلون گردید. با ایجاد جهش های دلخواه دراین پروموتر می توان به نقش اجزاء تشکیل دهنده پروموتر در کنترل بیان آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز پی برد. به نظر می رسد با تولید این جهش ها و انجام مطالعات بیوشیمیایی و ساختاری بر روی آن ها می توان به درک بهتری از مکانیسم عملکردی پروموتر بر روی بیان این آنزیم دست یافت و اثرات احتمالی جهش های ناشناخته آن را درسطح فنوتیپ پیش بینی کرد.

واژگان کلیدی: فنیل کتونوری، فنیل آلانین هیدروکسیلاز، ال- فنیل آلانین، فاکتور هسته ای کبدی شماره یک

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- فنیل کتونوری ۱

۱-۲- آنزیم های هیدروکسیله کننده اسیدآمینه های آروماتیک ۲

۱-۳- آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۳

۱-۳-۱- ویژگی های مولکولی و ساختاری آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۴

۱-۳-۲- ویژگی های ژنتیکی آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۸

۱-۴- جهش های موجود در آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۸

۱-۴-۱- جهش های جایگزینی ۱۱

۱-۴-۱-۱- جهش هایی که در اسیدآمینه های موجود در جایگاه فعال رخ می دهد ۱۱

۱-۴-۱-۲- جهش های موجود در اسیدآمینه های ساختاری آنزیم ۱۲

۱-۴-۱-۳- جهش در اسیدآمینه هایی که در برهمکنش بین دامنه ای در هر منومر دخالت دارند ۱۳

۱-۴-۱-۴- جهش در اسیدآمینه هایی که با ARS در N– انتهایی آنزیم، برهمکنش می کنند ۱۳

۱-۴-۱-۵- جهش در اسیدآمینه هایی که در نواحی بینابینی فرم های دایمر و تترامر آنزیم هستند ۱۳

۱-۴-۲- جهش های حذف و اضافه ۱۴

۱-۵- ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۱۵

۱-۵-۱- فاکتورهای رونوشت برداری هسته ای کبدی ۱۶

۱-۵-۲- فاکتور هسته ای کبدی-۱ ..... ۱۶

۱-۵-۳- تعیین محل های اتصال HNF-1 ..... ۲۰

۱-۵-۴- عناصر کنترلی در پروموتور ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۲۱

۱-۵-۵- ناحیه پروکسیمال پروموتور ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۲۳

۱-۵-۵-۱- شناسایی محل قرارگیری فاکتورهای رونویسی در ناحیه پروکسیمال ژن *hPAH* ۲۴

۱-۵-۵-۲- فاکتورهای رونویسی در ناحیه پروکسیمال ژن *hPAH* ۲۵

۱-۶- تنظیم بیان آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۲۵

۱-۶-۱- فعال سازی توسط فنیل آلانین ۲۶

۱-۶-۲- فعال سازی توسط فسفریلاسیون ۲۶

۱-۶-۳- مهار فعالیت آنزیمی توسط تتراهیدروبیوپترین ۲۷

۱-۶-۴- مهار فعالیت آنزیمی توسط کاتکول آمین ها ۲۷

عنوان | صفحه

۱-۷- مکانیسم مولکولی واکنش ۲۸
۱-۸- کلون نمودن cDNA و ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۲۹
۱-۹- اهداف این پروژه ۳۰

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه باکتریایی ۳۱
۲-۲- وکتور ۳۱
۲-۳- محیط های کشت ۳۳
۲-۳-۱- محیط کشت لوریا- برتنی (LB) ۳۳
۲-۳-۲- محیط کشت لوریا- برتنی آگار (LBA) ۳۴
۲-۳-۳- محیط کشت لوریا- برتنی آگار به همراه IPTG، X-Gal و آمپی سیلین ۳۵
۲-۳-۳-۱- IPTG ۳۵
۲-۳-۳-۲- X-Gal ۳۵
۲-۳-۳-۳- محیط LBA-Ampicilin X-Gal/IPTG ۳۵
۲-۴- شرایط کشت و نگهداری سوش های باکتریایی ۳۵
۲-۴-۱- باکتری اشرشیاکولی ۳۵
۲-۵- نمونه گیری ۳۶
۲-۶- استخراج DNA از خون محیطی ۳۶
۲-۶-۱- مواد مورد نیاز ۳۶
۲-۶-۲- محلول ها و بافرهای مورد نیاز ۳۶
۲-۶-۳- محلول ۵٪ مولار اتیلن دی آمینو تتراستیک اسید (EDTA) (PH=8) ۳۷
۲-۶-۴- محلول ۱ مولار Tris-HCl (PH=7/5-8) ۳۷
۲-۶-۵- محلول کلرور سدیم ۶ مولار ۳۷
۲-۶-۶- محلول تریس- اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (TE) ۳۷
۲-۶-۷- روش استخراج DNA ژنومی از سلول های خونی ۳۸
۲-۷- تعیین کیفیت و کمیت DNA ۳۹
۲-۷-۱- تعیین کیفیت و غلظت DNA به روش اسپکتروفتومتری ۳۹
۲-۷-۲- تعیین کیفیت و غلظت DNA توسط ژل آگارز ۳۹

عنوان | صفحه

۲-۸- خالص سازی نمونه های DNA از ژل ۴۰
۲-۸-۱- مواد لازم برای خالص سازی نمونه های DNA از ژل ۴۰
۲-۸-۲- طرز تهیه بافر شستشو غلیظ ۴۰
۲-۸-۳- روش استخراج و خالص سازی نمونه های DAN از ژل ۴۱
۲-۹- الکتروفورز DNA ۴۳
۲-۹-۱- مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ۴۳
۲-۹-۱-۱- بافر TBE ۴۳
۲-۹-۱-۲- بافر TAE ۴۳
۲-۹-۱-۳- اتیدیوم بروماید ۴۴
۲-۹-۱-۴- ژل آگارز ۴۴
۲-۹-۱-۵- مارکرهای DNA ۴۵
۲-۹-۱-۶- لودینگ بافر ۴۶
۲-۹-۲- روش الکتروفورز ۴۶
۲-۱۰- پرایمرها ۴۷
۲-۱۰-۱- طراحی پرایمرها ۴۷
۲-۱۰-۲- رقیق کردن پرایمرها ۴۸
۲-۱۱- تکنیک PCR ۴۸
۲-۱۱-۱- مواد مورد نیاز برای PCR ۴۸
۲-۱۱-۲- روش انجام تکنیک PCR ۴۹
۲-۱۲- تکنیک Colony-PCR ۵۰
۲-۱۳- تکنیک Insert-Check ۵۰
۲-۱۳-۱- تهیه Restriction Map برای تکنیک Insert-Check ۵۰
۲-۱۳-۲- روش انجام تکنیک Insert-Check ۵۳
۲-۱۴- تکنیک Ligation ۵۳
۲-۱۴-۱- مواد لازم برای تکنیک Ligation ۵۳
۲-۱۴-۲- روش انجام تکنیک Ligation ۵۴
۲-۱۵- تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* به روش کلرید کلسیم ۵۴
۲-۱۵-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۵۴

عنوان | صفحه

۲-۱۵-۲- روش تهیه سلول‌های مستعد *E.coli* ۵۴
۲-۱۶- ترانسفورماسیون ۵۵
۲-۱۶-۱- روش انجام ترانسفورماسیون ۵۵
۲-۱۷- Minipreparation و استخراج پلاسمید ۵۶
۲-۱۷-۱- مواد مورد نیاز برای استخراج پلاسمید ۵۶
۲-۱۷-۱-۱- محلول تریس (Tris) ۵۶
۲-۱۷-۱-۲- محلول اتیلن دی آمینو تترا استیک اسید (EDTA) ۵۷
۲-۱۷-۱-۳- بافر Tris-Base- EDTA (TE) ۵۷
۲-۱۷-۱-۴- محلول آلکالین لیزیس I ۵۷
۲-۱۷-۱-۵- محلول آلکالین لیزیس II ۵۷
۲-۱۷-۱-۶- محلول آلکالین لیزیس III ۵۷
۲-۱۷-۱-۷- محلول STE ۵۸
۲-۱۷-۲- روش استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی ۵۸
۲-۱۸- هضم آنزیمی با آنزیم محدود الاثر بر روی پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* ۵۹
۲-۱۸-۱- روش هضم آنزیمی با آنزیم های محدود الاثر ۶۰
۲-۱۹- آماده سازی و ارسال نمونه ها برای انجام توالی یابی ۶۱

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- خون گیری و استخراج DNA از خون ۶۲
۳-۲- تکثیر ناحیه پروموتوری از ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی ۶۳
۳-۲-۱- طراحی پرایمرها ۶۳
۳-۲-۲- تکثیر پروموتور ژن *PAH* توسط تکنیک PCR ۶۶
۳-۳- نتایج هضم آنزیمی محصول PCR ۶۷
۳-۴- استخراج DNA از ژل ۶۸
۳-۵- تعیین غلظت DNA پروموتوری استخراج شده از ژل ۶۹
۳-۶- کشت و تهیه باکتری *Escherichia coli* JM109 ..... ۷۰
۳-۷- کلونینگ ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* در پلاسمید pTZ57R/T ۷۱
۳-۷-۱- ترانسفورماسیون پلاسمید pComb3 ..... ۷۱

عنوان | صفحه

۳-۷-۱-۱- نتایج ترانسفورماسیون پلاسمید pComb3 در سویه JM109 ..... ۷۱
۳-۷-۱-۲- کارایی ترانسفورماسیون ۷۲
۳-۷-۲- تکنیک Ligation ۷۲
۳-۷-۳- ترانسفورماسیون پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* ۷۳
۳-۸- تأیید DNA پروموتوری کلون شده ۷۳
۳-۸-۱- کلنی PCR بر روی باکتری های ترانسفورم شده با پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* ۷۳
۳-۸-۲- استخراج پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* ۷۴
۳-۸-۳- تأیید ساختار پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* توسط PCR ۷۵
۳-۸-۴- تأیید ساختار پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* توسط هضم آنزیمی ۷۶
۳-۸-۵- جهت یابی و نحوه قرارگیری پروموتور *hPAH* در پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* ۷۷

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- فنیل کتونوری و آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۸۰
۴-۲- ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۸۲
۴-۳- انجام توالی یابی ۸۳
۴-۳-۱- نتایج انجام توالی یابی ۸۳
۴-۳-۲- BLAST نمودن ناحیه پروموتوری حاصل از توالی یابی، در سایت NCBI ۸۳
۴-۳-۳- شناسایی عناصر سیس واقع در ناحیه ۶۷۰ جفت بازی از پروموتور ژن *hPAH* ۸۷
۴-۳-۳-۱- شناسایی جعبه های GC (GC Boxes) ۸۸
۴-۳-۳-۲- شناسایی جعبه های GRE (GRE Boxes) ۹۰
۴-۳-۳-۳- شناسایی جعبه CCAAT (CCAAT Box) ۹۲
۴-۳-۳-۴- شناسایی جعبه های AP-2 (AP-2 Boxes) ۹۲
۴-۳-۴- محل جایگاه های A، B و C در ناحیه پروکسیمال از پروموتور ژن *hPAH* ۹۳
۴-۳-۴-۱- محل جایگاه A در ناحیه پروکسیمال پروموتور ژن *hPAH* ۹۴
۴-۳-۴-۲- محل جایگاه B در ناحیه پروکسیمال پروموتور ژن *hPAH* ۹۵
۴-۳-۴-۳- محل جایگاه C در ناحیه پروکسیمال پروموتور ژن *hPAH* ۹۵
۴-۳-۵- مقایسه توالی پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی های متناظر در موش و موش صحرایی .. ۹۶
۴-۳-۵-۱- مقایسه مقایسه توالی پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی متناظر در موش ۹۷
۴-۳-۵-۲- مقایسه توالی پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی متناظر در موش صحرایی ۹۷

عنوان **صفحه**

۴-۳-۶- مقایسه جایگاه های A، B و C از پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی های متناظر در موش و موش صحرایی ۹۸
۴-۴- پیشنهادات ۱۰۰
منابع و مأخذ ۱۰۶

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۱-۱: واکنش هیدروکسیلاسیون توسط آنزیم های هیدروکسیله کننده اسیدآمینه های آروماتیک ۰۰ ۳

شکل ۱-۲: ساختار سه بعدی آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۵

شکل ۱-۳: نمای سه بعدی از جایگاه فعال آنزیم PAH در دامنه کاتالیتیک ۶

شکل ۱-۴: مقایسه ساختار سه بعدی دو آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز و تیروزین هیدروکسیلاز ۷

شکل ۱-۵: نمای شماتیک از چگونگی اتصال HNF-1 به DNA ۱۷

شکل ۱-۶: دامنه های تشکیل دهنده HNF-1α ۱۸

شکل ۱-۷: فعالیت کواکتیویتوری DCoH ۱۹

شکل ۱- ۸: مقایسه قسمتی از توالی۱/۷ کیلو بازی پروموتور ژن *PAH* موشی و انسانی ۲۱

شکل ۱- ۹: نمای شماتیک از قسمتی از نواحی پروموتوری ژن *PAH* انسان و موش ۲۲

شکل ۱-۱۰: نمای شماتیک از جایگاه های HSSIII و hssIII ۲۳

شکل ۱-۱۱: فوت پرینتینگ از ناحیه پروکسیمال پروموتور ژن *PAH* ۱۴

شکل ۱-۱۲: مدل فرضی جایگاه فعال آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز ۲۹

شکل۲-۱: دیاگرام شماتیک وکتور pTZ57R/T ۳۲

شکل۲-۲: توالی ناحیه Multiple Cloning Site پلاسمید pTZ57R/T ۳۳

شکل ۲-۳: ساختار شیمیایی اتیدیوم بروماید ۴۴

شکل ۲-۴ : سه نوع مارکر مورد استفاده در این پژوهش ۴۶

شکل۲-۵: Restriction Map توالی پروموتوری ژن *PAH* برای آنزیم های محدودالاثری کـه فقـط آن را یک بار برش می دهند ۵۱

شکل۲-۶: برش قطعه DNA مورد نظر بر اساس Restriction Map آنزیم *Sma*I ۵۲

شکل۲-۷: لیست آنزیم های محدودالاثری که برشی روی پروموتور *PAH* ایجاد نمی کنند ۵۲

شکل ۳-۱: DNA ژنومی استخراج شده از خون محیطی انسان ۶۳

شکل۳-۲: نتایج حاصل از تدوین پرایمر رفت برای پروموتور ژن *hPAH* ۶۴

شکل ۳-۳: نتایج حاصل از تدوین پرایمر برگشت برای پروموتور ژن*hPAH* ۶۴

شکل۳-۴ : نتایج حاصل از Primer Duplexes برای پرایمرهای پروموتور ژن *hPAH* ۶۵

شکل۳-۵: نتایج حاصل از Composition برای پرایمرهای پروموتور ژن *hPAH* ۶۵

شکل ۳-۶: تعیین شرایط مناسب جهت PCR در محیط نرم‌افزار Oligo6 ۶۶

شکل ۳-۷: نتایج PCR پروموتور ژن *hPAH* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی(PPAH) ۶۷

عنوان | صفحه

شکل ۳-۸: هضم آنزیمی محصول PCR پروموتور ژن *hPAH* ۶۸

شکل ۳-۹: الکتروفورز ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* با مارکر bp ۵۰ به منظور استخراج از روی ژل ۶۹

شکل ۳-۱۰: الکتروفورز پروموتور ژن *hPAH* به منظور تعیین غلظت..... ۷۰

شکل ۳-۱۱: کلنی باکتریهای *E.coli* JM109 بر روی محیط LB آگار بدون آمپی سیلین..... ۷۰

شکل ۳-۱۲: کلنی باکتریهای *E.coli* JM109 با پلاسمید pComb3..... ۷۱

شکل ۳-۱۳: کلنی‌های باکتریایی *E.Coli* JM109 ترانسفورم یافته با پلاسمید جدید pTZ57R/T-*PPAH*..... ۷۳

شکل ۳-۱۴: تأیید ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* توسط کلنی PCR با پرایمرهای PPAH..... ۷۴

شکل ۳-۱۵: استخراج پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* از باکتری *E. coli* JM109 ترانسفورم شده . ۷۵

شکل ۳-۱۶: تأیید پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* استخراج شده از باکتری *E.coli* JM109 ترانسفورم شده با استفاده از PCR و با حضور پرایمرهای PPAH..... ۷۶

شکل ۳-۱۷: هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH* با دو آنزیم محدودالاثر *EcoR*I و *Rsa*I.. ۷۷

شکل۳-۱۸: دو نوع جهت گیری ممکن برای پروموتور *hPAH* در پلاسمید pTZ57R/T-*PPAH*... ۷۸

شکل ۴-۱: BLAST نمودن قسمتی از ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* کلون شده در سایت NCBI... ۸۴

شکل ۴-۲: نتایج حاصل از مقایسه اولیه Blast 2 Sequences برای ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* و ناحیه کلون شده..... ۸۵

شکل ۴-۳: مقایسه توالی نوکلئوتیدی ناحیه پروموتوری ژن *hPAH* (استخراج شده از NCBI) و توالی نوکلئوتیدی ناحیه کلون شده..... ۸۶

شکل ۴-۴: نمایی از سایت Cis-element Cluster Finder..... ۸۷

شکل ۴-۵: نتایج شناسایی عناصر سیس واقع در ناحیه پروموتوری ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز توسط سایت Cis-element Cluster Finder..... ۸۸

شکل ۴-۶: توالی مربوط به اولین GC Box در منطقه ۴۶۱- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۸۹

شکل ۴-۷: توالی مربوط به دومین GC Box در منطقه ۲۳۷- از نقطه شروع رونویسی برای ژن*hPAH*.۸۹

شکل ۴-۸: توالی آخرین GC Box واقع در منطقه ۱۶۰- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH*... ۹۰

شکل ۴-۹: توالی اولین GRE Box واقع در ناحیه ۴۳۷- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH*.. ۹۰

شکل ۴-۱۰: دومین GRE Box واقع در ناحیه ۳۳۹- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH*..... ۹۱

عنوان صفحه

شکل ۴-۱۱: آخرین GRE Box واقع در ناحیه ۱۸۱- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۱
شکل ۴-۱۲: CCAAT Box واقع در ناحیه ۴۰۹- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۲
شکل ۴-۱۳: اولین AP-2 Box واقع در ناحیه ۳۸۸- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۳
شکل ۴-۱۴: دومین AP-2 Box واقع در ناحیه ۳۳۷- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۳
شکل ۴-۱۵: توالی نوکلئوتیدی جایگاه A واقع در ناحیه ۱۰۶- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۴
شکل ۴-۱۶: توالی نوکلئوتیدی جایگاه B واقع در ناحیه ۷۳- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۵
شکل ۴-۱۷: توالی نوکلئوتیدی جایگاه C واقع در ناحیه ۱۰- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۶
شکل ۴-۱۸: مقایسه توالی پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی متناظر در موش ۹۷
شکل ۴-۱۹: مقایسه توالی پروکسیمال پروموتور *hPAH* با توالی متناظر در موش صحرایی ۹۸
شکل ۴-۲۰: توالی نوکلئوتیدی جایگاه C واقع در ناحیه ۱۰- از نقطه شروع رونویسی برای ژن *hPAH* ۹۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: تعداد و توالی اگزون های cDNA ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسانی ۸

جدول ۱-۲: فرمول تعدادی از جهش های جایگزینی موجود در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز انسان و تغییرات ساختاری حاصل از آن ۹

جدول ۱-۳ : برخی از جهش های حذف و اضافه شناخته شده در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز و تغییرات ساختاری حاصل از آنها LB ۱۵

جدول ۲-۱: فرمول محیط کشت LB ۳۴

جدول ۲-۲: پرایمرهای PPAH و مشخصات آنها ۴۸

جدول ۲-۳: مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر ۴۹

جدول ۲-۴: مواد و مقادیر مورد نیاز برای واکنش لیگاسیون ۵۳

جدول ۲-۵ : نحوه انجام عمل هضم آنزیمی توسط آنزیم *EcoR*I ۶۱

جدول ۲-۶ : نحوه انجام عمل هضم آنزیمی توسط آنزیم *Rsa*I ۶۱

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- فنیل کتونوری[1]

فنیل کتونوری یا PKU یک بیماری ژنتیکی ناشی از نقص در مسیر متابولیسمی یک اسیدآمینه ضروری به نام فنیل آلانین می باشد. این بیماری بصورت اتوزومی مغلوب به ارث می رسد و در حقیقت نوعی نقص آنزیمی محسوب می شود (۱ و ۲). اثر اولیه این مهار آنزیمی عبارت است از افزایش سطح ال- فنیل آلانین[2] در پلاسما که به آن هیپر فنیل آلانینمی[3] می گویند (۳). کشف فنیل کتونوری توسط فولینگ[4] در سال ۱۹۳۴ میلادی اولین موردی بود که نشان می داد یک نقص ژنتیکی باعث عقب افتادگی ذهنی می گردد (۴). فولینگ نشان داد که الگوی وراثتی این بیماری بصورت اتوزومی مغلوب می باشد و با مهار متابولیسم فنیل آلانین همراه است.

در بیماران فنیل کتونوری، آنزیم قادر نیست اسید آمینه ضروری ال- فنیل آلانین (L-Phe) را به ال- تیروزین (L-Tyr) تبدیل کند لذا مقدار ال- فنیل آلانین در خون و ترشحات بیماران (از جمله ادرار) بالا می رود (۵). تجمع فنیل آلانین در بدن منجر به تولید حد واسط های سمی شده که درصورت عدم درمان باعث عقب افتادگی ذهنی می شود (۶).

---

1. Phenylketunoria
2. L-Phenylalanine
3. Hyperphenylalaninemia
4. Folling

فرم کلاسیک این بیماری (Classical PKU) برای اولین بار در سال ۱۹۳۴ توسط فولینگ شناسایی شد. تغییرات و اصول بیوشیمیایی آن هم برای اولین بار توسط جرویس[1] و در سال ۱۹۵۳ مورد بررسی قرار گرفت (۷). در سال های بعد مشخص شد که بیماری فنیل کتونوری نتیجه نقص در آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز[2] یا فنیل آلانین-۴-منواکسیداز است که خود ناشی از بروز جهش هایی در ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز می باشد. تا کنون مطالعات زیادی در رابطه با اندازه گیری فعالیت آنزیم در هر دو شرایط *in vivo* و *in vitro* صورت گرفته و نتایج آن مشخص گردیده است (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

در اکثر نوزادان فنیل کتونوری آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز دچار نقص شده است. در نتیجه در بدو تولد و هنگام شیرخوارگی اسید آمینه فنیل آلانین در بدن نوزاد تجزیه نمی گردد و مقادیر زیادی از این ماده شیمیایی خطرناک در بدن فرد انباشته می شود. انباشت فنیل آلانین در خون و سایر مایعات بدن موجب صدمات و آسیب های جبران ناپذیری به بافت های مختلفی از بدن به ویژه به مغز می گردد. کودکان بیمار در ابتدای تولد ظاهراً شبیه به کودکان سالم هستند و هیچ علائمی را در بدو تولد نشان نمی دهند. اما اثرات این بیماری خیلی زود و با صدماتی جبران ناپذیر آشکار می گردد. کودک مبتلا در اثر تجمع ماده سمی فنیل آلانین و اثر مخرب آن روی مغز، هر ماه حدود ۴ نمره ازبهره هوشی (IQ) خود را از دست می دهد. این بیماری با عقب ماندگی غالباً شدید ذهنی و برخی ناهنجاریهای دیگر (بیش فعالی، اختلالات گفتاری، تشنج و...) همراه است که با بالا رفتن سن کودک آشکار می شوند (۵).

امروزه در صورت شناسایی نوزادان مبتلا به بیماری فنیل کتونوری آنها را تحت رژیم های غذایی محدود شده[3] قرار می دهند بطوریکه میزان فنیل آلانین رژیم غذایی آنان به حداقل مقدار خود می رسد (۱۲ و ۱۳).

۱-۲- آنزیم های هیدروکسیله کننده اسیدآمینه های آروماتیک

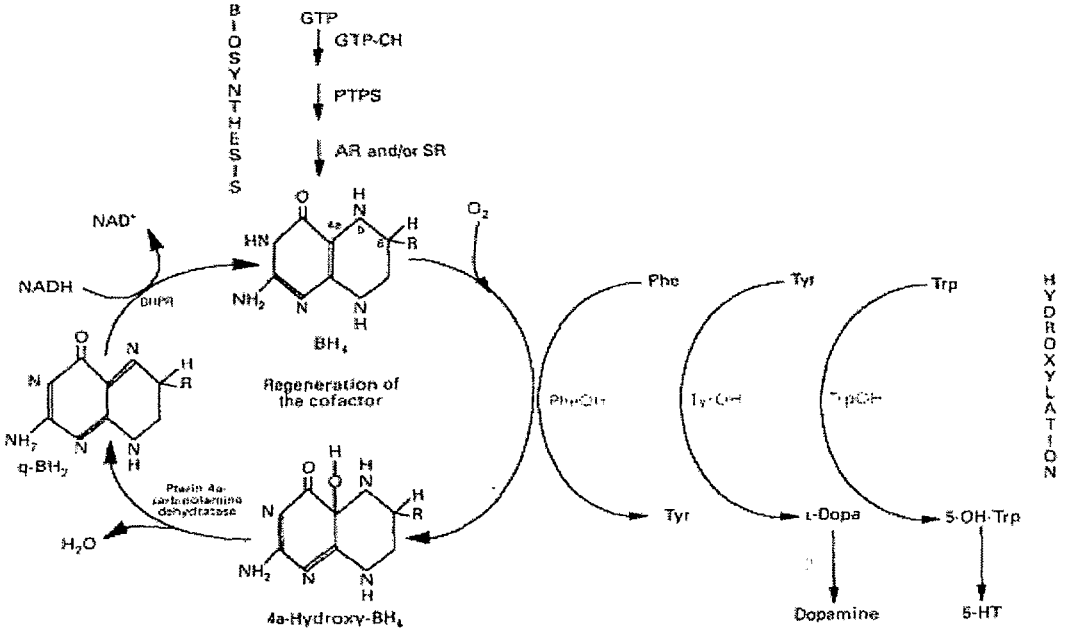
فنیل آلانین هیدروکسیلاز به همراه تیروزین هیدروکسیلاز[4] و تریپتوفان هیدروکسیلاز[5] ابر خانواده ای از آنزیم های هیدروکسیله کننده اسیدآمینه های آروماتیک را تشکیل می دهند که اصلی ترین مرحله در متابولیسم

---

1. Jervis
2. Phenylalanine Hydroxylase: PAH: PheOH
3. Low-Phenylalanine Diet
4. Tyrosine Hydroxylase: TH: TrpOH
5. Tryptophan Hydroxylase: TPH: TyrOH

اسیدآمینه های آروماتیک را کاتالیز می کنند. این سه آنزیم ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیکی یکسانی دارند و به نظر می رسد که از یک منشأ اولیه تکامل یافته اند (۱۴، ۱۵ و ۱۶).

تیروزین هیدروکسیلاز واکنش هیدروکسیله شدن تیروزین به L-Dopa و تریپتوفان هیدروکسیلاز واکنش هیدروکسیله شدن تریپتوفان به ۵- هیدروکسی تریپتوفان را کاتالیز می کنند (۱۹). هیدروکسیلاسیون اسیدآمینه های آروماتیک نیاز به کوفاکتورهای غیرپروتئینی[1] دارد که از جمله این کوفاکتورها می توان به تتراهیدروبیوپترین[2] (BH_4) اشاره کرد. این کوفاکتور با کمک آنزیم دهیدروپتریدین ردکتاز به فرم احیاء خود در می آید و بدین گونه در هیدروکسیلاسیون اسیدآمینه های آروماتیک مؤثر واقع می شود (شکل۱-۱).



شکل۱-۱: واکنش هیدروکسیلاسیون توسط آنزیم های هیدروکسیله کننده اسیدآمینه های آروماتیک (۱۷)

۱-۳- آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز

فنیل آلانین یک اسیدآمینه ضروری است که از طریق مواد غذائی وارد بدن می شود. تنها قسمت کوچکی از اسیدآمینه فنیل آلانین موجود در بدن برای ساخت پروتئین ها بکار می رود و بقیه از طریق هیدروکسیلاسیون آنزیماتیک تبدیل به تیروزین می شود. تیروزین پیش ساز هورمون های تیروئیدی، کاتکول آمین ها و ملاتونین

---

1. Non-Protein Cofactor
2. Tetrahydropteri