بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی- علوم سلولی مولکولی

بررسی بیان ژن نوروتروفین 4 در رت های نخاعی شده

استادان راهنما:

دکتر ابوالقاسم اسماعیلی

دکتر کامران قائدی

استاد مشاور:

دکتر مریم نوربخش نیا

پژوهشگر:

گلناز پاکروان

شهریور ماه 1390

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

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی سلولی-مولکولی خانم گلناز پاکروان

تحت عنوان

بررسی بیان ژن نوروتروفین ۴ در رت های نخاعی شده

در تاریخ ۹۰/۶/۳۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر ابوالقاسم اسماعیلی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۳- استاد مشاور پایان نامه دکتر مریم نور بخش نیا با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور داخل گروه دکتر سید جمال مشتاقیان با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۵- استاد داور خارج از گروه دکتر اردشیر طالبی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

به نام حضرت دوست

الهی، اگر یکبار بگویی; بنده‌ی من

از عرش بگذرد خنده‌ی من **خواجه عبدالله انصاری**

الهی تو را به بزرگی می‌ستایم و به نعمت های بی دریغ سپاس می گویمت.

به درگاه کبریایی ات روی می آورم و از این که راه زندگی ام را با چراغ علم روشن نمودی و محبت و دعای پدر و مادری دلسوز و مهربان را پشتوانه ام قرار دادی، نه به رسم عادت که از صدق دل به لطف تو، خانواده و اساتید ارجمندی که مرا در رسیدن به فردایی بهتر یاری نموده اند، سپاسگزارم.

چکیده

نوروتروفین‌ها، فاکتورهای رشد پلی پپتیدی هستند که توسط سلول های هدف سنتز و ترشح می شوند. چهار عضو از این خانواده شناخته شده اند: فاکتور رشد اعصاب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، نوروتروفین 3 و نوروتروفین 4. اثرهای زیستی این فاکتورها با اتصال به گیرنده‌های گذرنده از غشاء آغاز می‌شود. نوروتروفین‌ها با دو گروه از گیرنده‌های سطح سلولی بر همکنش می‌دهند. گروه اول گیرنده‌های تیروزین کیناز (Trk) است که با میل ترکیبی زیادی به نوروتروفین ها وصل می‌شوند. TrkA پاسخ زیستی NGF را وساطت می‌کند، TrkC توسط NT3 فعال می‌شود و BDNF و NT4 لیگاند ترجیحی برای rkBT هستند. گروه دوم گیرنده‌ای با میل ترکیبی کم است، P75، که دومین تیروزین کینازی ندارد. نوروتروفین‌ها در دستگاه عصبی در تمایز و بقای نورون‌ها، سازماندهی دوباره‌ی طناب نخاعی آسیب دیده و تعدیل نورو پلاستی سیته وابسته به فعالیت، ایجاد فیبرهای عصبی، مهار مرگ برنامه ریزی شده‌ی نورون‌ها در طول تکوین و رشد آکسون‌ها دخیلند.

آسیب نخاعی (Spinal Cord Injury) یک واقعه‌ی پیچیده همراه با آسیب های فیزیولوژی متعدد است. از اثرات آسیب نخاعی، مرگ نورون ها، تخریب وسیع آکسونی، دمیلینه شدن نورون های سالم ودست نخورده، التهاب، مرگ سلولی و نقص های شدید حسی وحرکتی می شود.

در این تحقیق میزان تغییرات بیان mRNA نوروتروفین 4 و گیرنده آن Trk-B، در رت ، 6، 24 و 72 ساعت و 7 و 10 روز پس از ایجاد آسیب در محل ضایعه و همچنین بالا و پایین محل ضایعه به روش Quantitative Real-time PCR بررسی شد. به این منظور RNA این ژن ها استخراج و از آن ها cDNA ساخته شد و طراحی پرایمر نیز با استفاده از نرم افزار Beacon انجام شد.

نتایج بدست آمده نشان داد که بیان این ژن ها پس از ضایعه تغییر می کند. به طوری که بیان NT4 در ناحیه بالای ضایعه پس از افزایش در 6 ساعت اول و در مرکز و پایین ضایعه بدون این که افزایش یابد، کاهش می یابد. بیان ژن Trk-B نیز در تمام نواحی مورد نظر پس از افزایش در ساعات اولیه شروع به کاهش می کند.

پس از ضایعه نخاعی، تجدید عملکردهای کنترل شده بستگی به بازتولید اکسون ها در سرتاسر محل آسیب و تشکیل ارتباطات سیناپسی و عملکردی دارد. اگرچه بازتولید و ترمیم اعصاب بعد از آسیب نخاعی هنوز دشوار است اما نوروتروفین ها به عنوان فاکتورهایی شناخته شده اند که در توسعه ی آکسون های آسیب دیده و افزایش توانایی رشد اکسون ها و نوروپلاستی سیته دخیلند. بیان نوروتروفین‌ها در نورون هایی که به دلیل بیماری‌های تخریب اعصاب آسیب دیده‌اند، تغییر می‌کند و تعدیل میزان نوروتروفین‌ها در این بیماری‌ها می‌تواند مزایای درمانی داشته باشد. از این رو افزایش اطلاعات در زمینه‌ی مسیرهای ملکولی و نقش‌های فیزیولوژیکی فاکتورهای نوروتروفیک می تواند منجر به استفاده از آن ها به عنوان فاکتورهای درمانی شود.

کلید واژه ها: نوروتروفین، گیرنده تیروزین کیناز، ضایعه نخاعی، نوروتروفین 4، Real-time PCR

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: کلیات	1
1-1 نوروتروفین ها	1
1-1-1 ساختار نوروتروفین ها	3
1-1-2 عملکرد نوروتروفین ها	3
1-1-3 اعضای خانواده نوروتروفین ها	4
1-1-3-1 نوروتروفین 4	5
1-1-4 پردازش نوروتروفین ها	6
1-1-5 مسیر ترشحی نوروتروفین ها	7
1-1-6 فرضیه نوروتروفیک	8
1-1-7 مسیرهای مختلف نورون ها برای به دست آوردن نوروتروفین ها	9
1-1-8 گیرنده های نوروتروفینی	9
1-1-8-1 گیرنده های تیروزین کیناز	9
1-1-8-1-1 ساختار گیرنده های تیروزین کیناز	10
1-1-8-1-2 نقش تیروزین های موجود در ساختار گیرنده های تیروزین کیناز	12
1-1-8-1-3 گیرنده Trk-B	12
1-1-8-2 گیرنده p75	12
1-1-8-3 ارتباط بین گیرنده های تیروزین کینازی و p75	14
1-1-9 مسیر انتقال پیام	15
1-1-9-1 تفاوت های انتقال پیام توسط BDNF وNT4	18
1-1-10 کنترل پاسخ نوروتروفین ها از طریق تنظیم بیان ژن و مکانیسم های پس از رونویسی	18
1-1-11 بیان زمانی و مکانی نوروتروفین ها	20
1-1-12 تکامل ملکولی نوروتروفین ها و گیرنده هایشان	20
1-2- تغییر بیان ژن ها برای بقا و باز تولید پس از آسیب	22
1-3- آسیب نخاعی	22
1-3-1- فیزیولوژی آسیب نخاعی	23
1-4 اثرات درمانی نوروتروفین ها	25

عنوان **صفحه**

1-4-1- مکانیسم باز تولید اکسونی توسط فاکتورهای نوروتروفیک 26
5-1 اهدافی که در این تحقیق دنبال می شوند 27
6-1 اهمیت و کاربرد نتیجه های تحقیق 27
فصل دوم: مواد و روش‌ها 29
۲-۱ تجهیزات و دستگاه‌ها 29
2-2 مراحل تهیه cDNA 30
1-2-2 حیوانات 31
1-1-2-2 نخاعی کردن رت ها 31
2-1-2-2 استخراج بافت نخاع از رت ها 32
2-2-2 استخراج RNA 32
1-2-2-2- پروتوکل استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus وRNeasy Mini Kit 33
2-2-2-2 بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده 34
1-2-2-2-2 ارزیابی کمی RNAی استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر 34
2-2-2-2-2 ارزیابی کیفی RNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز 34
1-2-2-2-2-2 تهیه ژل آگارز 34
1-1-2-2-2-2-2 بافر Tris-HCl 35
2-1-2-2-2-2-2 بافر الکتروفورز TAE 10x 35
3-1-2-2-2-2-2 اتیدیوم بروماید 35
4-1-2-2-2-2-2- لودینگ بافر 36
5-1-2-2-2-2-2- شناساگر اندازه گیری DNA 36
2-2-2-2-2-2- طرز تهیه ژل آگارز و ران کردن نمونه ها بر روی آن 36
3-2-2 ساخت cDNA از RNA بدست آمده به منظور استفاده در Real-time PCR 37
1-3-2-2- مراحل سنتز cDNA 37
3-2- طراحی پرایمر مناسب 38
1-3-2 PCR معمولی 40
1-1-3-2 پروتکل واکنش PCR 41
4-2- سایبر گرین 41
5-2 تیوب ویژه Real Time PCR 42
6-2 Real Time PCR 42
1-6-2 تعیین غلظت مناسبcDNA 42

عنوان	صفحه

2-6-2واکنشReal time PCR	43
۷-۲ تحلیل آماری نتایج	44
فصل سوم: نتایج	45
۱-۳ نتایج حاصل از ارزیابی کیفی و کمی RNA استخراج شده	45
1-1-3 نتایج اسپکتروفتومتری	46
2-1-3 نتیجه ژل الکتروفورز	47
2-3 نتیجه ژل الکتروفورز محصولاتPCR	47
3-3 نتایج حاصل از انتخاب غلظت مناسب cDNA	48
4-3 منحنی‌هایReal Time PCR	48
1-4-3 منحنی دمای ذوب	49
5-3 نتایج تحلیل آماری	50
1-5-3 تغییرات بیان ژن NT4 در بالای محل ضایعه	50
2-5-3 تغییرات بیان ژن NT4 در محل ضایعه	51
3-5-3 تغییرات بیان ژن NT4 در پایین محل ضایعه	52
4-5-3 تغییرات بیان ژن Trk-B در بالای محل ضایعه	53
5-5-3 تغییرات بیان ژن Trk-B در محل ضایعه	54
6-5-3 تغییرات بیان ژن Trk-B در پایین محل ضایعه	55
فصل چهارم	56
۱-۴ بحث	56
1-1-4 بررسی بیان ژن نوروتروفین 4 پس از ضایعه نخاعی	57
2-1-4 بررسی بیان ژن تیروزین کیناز B پس از ضایعه نخاعی	58
3-1-4 مطالعاتی که بر روی تغییر بیان سایر نوروتروفین ها وگیرنده هایشان انجام گرفته است	59
4-1-4 نقش نوروتروفین ها در ترمیم پس از آسیب نخاع	60
2-4 نتیجه گیری	61
3-4 پیشنهادات	62
منابع و ماخذ	63

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل 1-1 اتصال بین نوروتروفین ها وگیرنده هایشان 2
شکل 1- 2 ساختار پری پرو نوروتروفین و محل گلیکوزیله شدن NT4 5
شکل 1-3 مسیرهای ترشحی نوروتروفین ها 7
شکل1-4 فرضیه نوروتروفیک 8
شکل1-.5 راه های کسب نوروتروفین ها توسط نورون ها 10
شکل1- 6 ساختار گیرنده های نوروتروفینی و ارتباطشان با نوروتروفین ها 14
شکل1- 7 مسیرهای انتقال پیام نوروتروفین ها 17
شکل 1-8 آسیب اولیه و ثانویه نخاعی 25
شکل 2-1 رت آزمایشگاهی 32
شکل 2-2 BLAST پرایمر مربوط به ژن NT4 40
شکل 2-3 BLAST پرایمر مربوط به ژن Trk-B 40
شکل2-4 سریال رقت برای بدست آوردن غلظت مناسب cDNA 43
شکل 3-1 تصویر ژل الکتروفورز RNA 47
شکل 3-2 تصویر ژل الکتروفورز تعیین دمای annealing 47
شکل3-3 نتایج سریال رقت cDNA 48
شکل3-4 منحنی Ct ژن NT4 و ژن خانه گردان 48
شکل 3-5 منحنی ذوب ژن NT4 49
شکل3 -6 منحنی ذوب ژن Trk-B 49
شکل 3-7 منحنی ذوب ژن خانه گردان 50
شکل 3-8 نمودار بیان ژن NT4 در بالای محل ضایعه 50
شکل3-9 نمودار بیان ژن NT4 در محل ضایعه 51
شکل 3-10 نمودار بیان ژن NT4 در پایین محل ضایعه 52
شکل 3-11 نمودار بیان ژن Trk-B در بالای محل ضایعه 53
شکل3-12 نمودار بیان ژن Trk-B در محل ضایعه 54
شکل3-13 نمودار بیان ژن Trk-B در پایین محل ضایعه 55

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول 2-1 لیست دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز 29
جدول 2-2 سایز قطعات DNA در مقابل غلظت مناسب از ژل به منظور تفکیک آن ها 35
جدول 2-3 قسمتی از پروتوکل سنتز cDNA 37
جدول 2-4 قسمت دیگری از پروتوکل سنتز cDNA 38
جدول 2-5 توالی پرایمرهای طراحی شده 39
جدول ۲-۶ خصوصیات پرای‌مرهای طراحی شده ۳۹
جدول 3-1 نتایج اسپکتروفتومتری سری اول مربوط به نواحی بالا، مرکز و زیر محل برش 46
جدول 3-2 نتایج اسپکتروفتومتری سری دوم مربوط به نواحی بالا، مرکز و زیر محل برش 46

فصل اول

کلیات

1-1- نوروتروفین ها

نوروتروفین ها، فاکتورهای رشد پلی پپتیدی هستند که همولوگی زیادی دارند و توسط سلول ها ترشح می شوند. این مولکولهای آلی و محلول کوچک بوده و وزن ملکولی بین 13 تا 24 کیلو دالتون دارند. فاکتور رشد اعصاب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF)، نوروتروفین 3 و نوروتروفین 4 از لحاظ ساختاری و عملکردی به یک دیگروابسته اند ومتعلق به خانواده‌ی نوروتروفین‌ها هستند. NT6 وNT7 نیز عضو این خانواده هستند که فقط در ماهی یافت می شوند و مشابهی در انسان ندارند (Chao et al., 2006).

لغت نوروتروفیک از کلمه یونانی نورو به معنی عصب و تروف به معنای تغذیه وقوت مشتق شده است. نوروتروفین به ملکولی گفته می شود که غذای نورون را بویژه در حفظ بقای نورون، تامین می کند. اگر در معنای کلمه دقت شود برای این که بتوان یک ملکول را فاکتور نوروتروفیک نامید، باید 4 معیار در نظر گرفته شود. (Chu and Wu, 2009).

۱) ضروری ولازم برای بقای نورونها باشد.

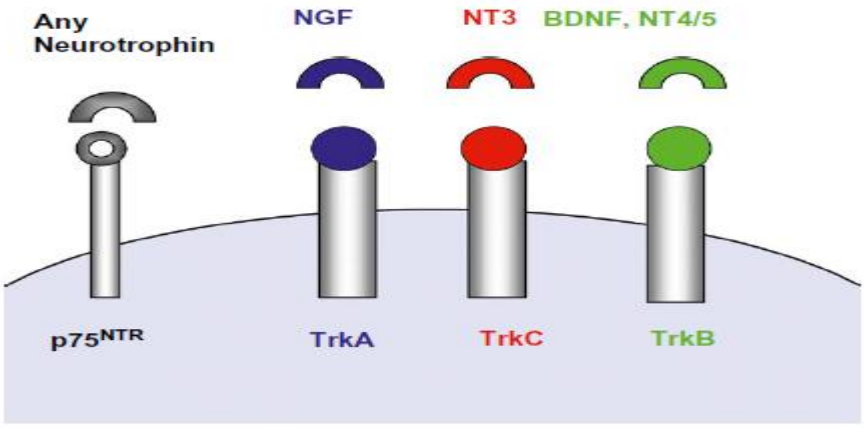
۲) از سلول هدف مشتق شده و به فرم فعال ترشح شود.

۳) تنها مقدار کمی از ملکول در بافت هدف در دسترس باشد.

۴) قرار گرفتن آن محدود به نورون های در حال تقویت[1] است.

[1] Innervating neurons

با افزایش دانسته هادرباره ی نوروتروفین مشخص شده است که آنها فقط مشتق از هدف نیستند بلکه برای بقای نورونها می‌توانند به صورت رفتی به سمت نورونها رفته و یا عملکرد اتوکرین یا پاراکرین داشته باشند. به علاوه برای اینکه بتوان یک ملکول را نوروتروفین نامید، باید خصوصیت درون سازی[2] لیگاند یا کمپلکس لیگاند – گیرنده را برای راه انداختن مسیرهای انتقال پیام داشته باشند تا بتواند بر فعالیت های نورونی اثر بگذارد.
نوروتروفین ها برای انجام اعمال زیستی خود در شرایط مختلف به دو نوع گیرنده که ازنظر ساختاری بهم مرتبط نیستند، متصل می شوند. و از این نظر که اعمال خود را از طریق دو گروه گیرنده اعمال می کنند، منحصر به فردند (Chao et al., 2006; Chu and Wu, 2009) .
تمامی نوروتروفین های بالغ با میل ترکیبی مشابهی به p75 متصل می شوند. فعالیت اختصاصی نوروتروفین ها بستگی به فعالیت سه گیرنده متفاوت تیروزین کنیاز (Trk) دارد. NGF بصورت اختصاصی TrkA را فعال می کند ،NT4/5,BDNF با TrkBبر همکنش می دهند در حالیکه NT3بهTrkCمتصل می شود (Lanave et al., 2007) . این اتصالات در شکل 1-1- نشان داده شده است.



شکل 1-1- اتصال بین نوروتروفین ها وگیرنده هایشان(polo, 2010).

نوروتروفین ها و گیرنده های Trk هم ریشه آنها در مهره داران شامل خزندگان، دوزیستان، ماهی ها، پرندگان و پستانداران یافت می شود. با این حال NT4/5 در مرغ که در حال حاضر تنها ژنوم کامل مهیا از پرندگان است یافت نمی شود. NT6 وNT7 که که در ماهی یافت شده است رابطه زیادی با NGF دارند و به صورت اختصاصی با TrkA فعال می شوند(Lanave et al., 2007; Reichard, 2006) .

[2] Internalize

1-1-1- ساختار نوروتروفین ها

نوروتروفین ها در ساختار و خصوصیاتی مثل ساختار سوم و گره سیستئین با دیگر فاکتورهای رشد شامل TGF-β[3] و فاکتوررشد مشتق از پلاکت نیز ، همولوژی دارند. خصوصیت برجسته خانواده گره سیستئین شامل حلقه ساخته شده توسط پلهای دی سولفیدی داخل سلولی، ناحیه اصلی شامل 6 سیستئین که 3 پیوند دی سولفیدی داخل زنجیره ای تشکیل می دهند، است که یک گره سیستئین محکم را تشکیل می دهد. گره سیستئین، تماس مونو دایمر ها و تشکیل دایمر با پیوند غیر کووالانی قوی را ممکن می کند (Reichard, 2006; Ip et al., 1992). پروتئین های بالغ نوروتروفین ها همودایمرهایی هستند که به صورت غیرکووالان بهم مربوط شده اند. همچنین بعضی از نوروتروفین های مونومر می توانند در شرایط آزمایشگاهی با دیگر مونومرها، هترودایمر تشکیل دهند. ساختار فضایی آن‌ها شامل 8 زنجیره‌ی β است که 4 جفت غیر موازی از زنجیره‌های 2β تایی تشکیل می‌دهد. ساختار گسترده با یک گره‌ی سیستئین که با 3 پیوند دی سولفیدی شکل گرفته، قفل شده است (Robinson et al., 1999; Reichard, 2006).

1-1-2- عملکرد نوروتروفین ها

نوروتروفین ها در خلال بر همکنش با گیرنده ، درون سازی و انتقال برگشتی، با عملکرد موضعی بر مخروط رشد و سیناپس وهم چنین تاثیر بر جسم سلولی و هسته که در فاصله بیشتری قراردارند ، اثرات خود را اعمال می کنند. آن ها تمایز، تکثیر، بقا و مرگ سلولهای نورونی و غیر نورونی را تحت تاثیر قرار می دهند. نوروتروفین ها نقش مهمی در تمامی جنبه های دینامیک دستگاه عصبی مرکزی و محیطی دارند. در دستگاه عصبی مرکزی برای سلامتی و عملکرد صحیح، لازمند. هم چنین رفتارهای عالی مثل حافظه، یادگیری و رفتار را وساطت می کنند). (Chao et al., 2006سازماندهی آناتومی طناب نخاعی آسیب دیده و تعدیل وابسته به فعالیت پلاستیسیتی نورونی (Gulino et al., 2004). تنظیم ارتباطات سیناپسی ، تقویت و رها شدن انتقال دهنده های عصبی، حسی، حرکتی ، درد و مهاجرت، بیان انتقال دهنده های عصبی و بلوغ سیناپس از عملکردهای آن ها در دستگاه عصبی است (Lipton, 1995; Polo, 2010). همانطور که گفته شد فاکتور های نوروتروفیک، محدود به نورونها نیستند، بلکه آنها بر گلیا مثل آستروسیت، الیگو دندروگلیا، میکروگلیا و سلول های شوان نیز عمل می کنند. تغییر در بیان آن‌ها با فرایندهای فیزیولوژیکی وپاتولوژیکی مثل ترمیم بعد از آسیب در بافت‌های غیر عصبی همراه است. این فاکتورها در بسیاری از نقص‌های التهابی وغیر التهابی، ترشح گلیکوکانژوگه‌ها از سلول‌های گابلت با فعال کردن مسیرهایی مثل MAPK/Raf/Ras دخیلند (Rios et al., 2007). در غدد رون ریز، دستگاه ایمنی ، تولیدمثل (مثلاً در بیضه نوروتروفین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها در اسپرماتوژنز درگیرند) (Seifer et al., 2002) و دستگاه قلبی-عروقی (مثلاً در تشکیل قلب، تنظیم تکوین عروق، بقای سلول های اندوتلیال و سلول های ماهیچه ی

[3] transforming growth factor-β

صاف عروق و تنظیم انژیوژنز از طریق مکانیسم‌های اتوکرین وپاراکرین) Caporali and Emanueli, 2009) (نیز می‌توان اثرات مختلف نوروتروفین‌ها را دید. فاکتور های نوروتروفین، مرگ سلولی القا شده توسط استرس اکسیدایتو را از طریق تحریک تغییر آتریمی گونه های فعال اکسیژن به ملکولهای غیر سمی، مهار تخلیه انرژی ترمیم DNA و تحریک فعالیت ضد آپوپتوزی مثل سنتر و جابجائی اعضای خانواده BCl-2، تضعیف می کنند). Reichard, 2006; Polo, 2010)

اثر نوروتروفین ها بستگی به میزان در دسترس بودن آنها ، میل ترکیبی شان به اتصال به گیرنده های گذرنده از غشاء و چرخه انتقال پیام که پس از فعال شدن گیرنده به راه می افتد، دارد (Chao et al., 2006).

1-1-3- اعضای خانواده نوروتروفین ها

در طول نیم قرن گذشته، چهار عضو از خانواده نوروتروفین ها جدا شدند. که از لحاظ ترادفی حدود 50 تا 60 در صد با یکدیگر همولوژی دارند (Polo, 2010).

اولین و اصلی ترین عضو خانواده نوروتروفینها که کشف شد، فاکتور شد اعصاب (NGF) بود. به همین دلیل این خانواده فاکتورهای رشد عصب نامیدند. این فاکتور برای اولین بار توسط Levi-Montalcini حدود 50 سال پیش، در طی تحقیق و جست و جو برای فاکتورهای رشدی، کشف شد که بتواند اثرات زیان آور حذف بافتهای هدف بر روی بقای نورونهای حسی و حرکتی را توضیح دهد. او مشاهده کرد که وقتی سارکومای موش به داخل جنین مرغ، انتقال داده شود، تومور، فاکتور موضعی را ترشح می کند که منجر به افزایش رشد گالنگیون های حسی و سمپاتیک می شود (Chu and Wu, 2009; Kernie and Parad, 2000; Reichard, 2006).

NGF دردستگاه عصبی محیطی بر نورونها ی سمپاتیک و نورونهای حسی مربوط به حس درد و دما عمل می کند و در دستگاه عصبی مرکزی بقا و عملکرد نورنهای کولینرژیک را در مغز قدامی، پیش می برد. این نورون ها به هیپوکمب می روند از این رو در حافظه که در آلزایمر در گیر است، مهمند (Reichard, 2006).

دومین عضو از این خانواده که جداسازی و شناخته شد، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) بود. BDNF توسط Barde و همکارانش از مغز خوک به عنوان فاکتور بقا برای جمعیت متعددی از نورونها که به NGF پاسخ نمی دهند، خالص و جدا سازی شد .کلونینگ ملکولی نشان داد که BDNF از لحاظ ساختاری وابسته به NGF است (Kernie and Parad, 2000). BDNF در تمام نواحی مغز پستان داران به جز جسم مخطط بیان می شود و بیشترین میزان بیان را در سلولها ی هرمی هیپوکمب و نئوکرتکس دارد. ترادف حفظ شده این دو پروتئین، جدا سازی کلون های کد کننده‌ی دو عضو دیگر از این خانواده را نیز، NT3 و NT4، ممکن کرد Lessmann et). al., 2003; Reichard, 2006)

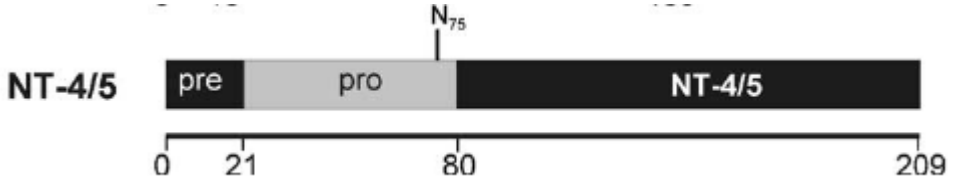
NT3 در سال 1990، توسط Ernfors وهمکاران از طریق همولوژی ترادفی NGF وBDNF کشف شد. این فاکتور بیشترین بیان را در تکوین پیش از تولد دارد (Lessmann et al., 2003).

1-1-3-1- نوروتروفین 4

چهارمین عضو از خانواده‌ی نوروتروفین‌هاست که برای اولین بار در سال 1991 توسط Berkemeier و همکارانش در زنوپوس و مار افعی یافت شد. بعد ها با استفاده از ویژگی ترادفی آن NT4 انسان و رت نیز از ژنوم جداسازی شدند. ژن این فاکتور در انسان بر روی کروموزوم *9*، *جایگاه 13.3q* و در رت بر روی کروموزوم 1 جایگاه *1q22* قرار دارد (Hibbert et al., 2003; Ip et al., 1992). از دو زیر واحد 130 آمینو اسیدی مشابه که از نظر ترادفی 48% با NGF مشابهند، تشکیل شده است. NT4 در طول تکامل کمتر حفظ شده است و خصوصیات غیر معمولی نسبت به سایر نوروتروفین ها دارد. به طوری که در گره سیستئین یک سیستئین اضافه بین سیستئین دوم و سوم وارد شده است. این ناحیه قادر به تحمل تغییرات بدون تاثیر بر ساختار نوروتروفین و برهمکنش آن با گیرنده است ترادف NT4 رت و انسان بیشتر وابسته به NT4 مار افعی است (با 65%همولوژی) تا سایر نوروتروفین ها (با حدود 50% همولوژی). ترادف بعد از این 7 اسید آمینه نیز بیشتر با زنوپوس (84% شباهت) همولوگ است تا سایر نوروتروفین ها (حدود 66% شباهت). شواهد نشان می دهد که نیروهای انتخابی بیشتر بر روی انتهای کربوکسیل اجرا شده است. بررسی NT4 در مهره داران پست تر نشان داد که NT4 سریعتر از سایر نوروتروفین ها منشعب شده است(Ip et al., 1992; Yin et al., 2001).

پروتئین پیش ساز NT4 (حدود 27 کیلودالتون) از NT3 کوتاهتر وفرم بالغ آن (حدود 14 کیلودالتون) از NT3 بزرگتر است. به دنبال کدون آغازی NT4 یک پپتید نشانه احتمالی ، یک پیش ناحیه که شامل تمام باقیمانده های ثابت مانند دیگر *نوروتروفین ها* است (شامل یک مکان گلیکوزیلاسیون مرتبط به ناحیه آمینی[4]) و یک محل شکافت دو بازی که توسط ترادف NT4 بالغ ادامه می یابد، قراردارد (Ip et al., 1992). در پرو دمین پرو NT4 مکان برای گلیکوزیله شدن به صورت وابسته به انتهای آمینی در منطقه 75 وجود دارد که در سایر نوروتروفین ها نیز مشاهده می شود. شکل 1-2- ساختار پری پرو نوروتروفین و محل گلیکوزیله شدن را نشان می دهد. گلیکوزیله شدن NT4 برای تا شدن مناسب پیش ساز و حفظ پایداری آن لازم است(Hibbert et al., 2003).

NT4 در سیتوپلاسم نورون های گره‌ی پشتی و شاخه‌ی پشتی L3 وL6 گلیاها و در هیپوکمب، قشر مخ، نورون های کولینرژیک مغز جلویی، نورون های دوپامینرژیک مغز میانی، در سلولهای عصبی شبکیه، سلول های شوان، مخچه وهیپوتالاموس بیان می‌شود (Lessmann et al., 2003).



1-2- ساختار پری پرو نوروتروفین و محل گلیکوزیله شدن NT4 (Lessmann et al., 2003).

[4] *N-Linked glycosylation*

توزیع RNAی NT4 به میزان محدودی در بافت های جانبی دیده شد. بیشترین میزان در پروستات و به میزان کمتر در تیموس ، جفت و ماهیچه اسکلتی و رونویس های کوچکتر آن در تمامی بافت ها بیان می شوند (Ip et al., 1992) . NT4 سلول های غدد درون ریزعصبی AtT -20 در مسیر بدون وقفه قرار می گیرد (Hibbert et al., 2003).

NT4 اثرات مختلفی بردستگاه عصبی دارد از قبیل : پیشبرد بقا، تکثیر و تمایز نورون ها و ترمیم نورون های آسیب دیده ی حسی، حرکتی، دوپامینرژیک و کولینرژیک (Lessmann et al., 2003) و حفاظت در مقابل استرس اکسیداتیو (Walz et al., 2009; Zhang et al., 2007)، تنظیم بیان گلیکوپروتئین‌های همراه میلین (Yin et al., 2001)، بقا و تمایز نورون های گابارژیک مخطط رت و جلوگیری از مرگ آن ها در بیماری هانتینگتون (Dusray et al., 2006) تسهیل انتقال سیناپس گلوتامرژیک در هیپوکمب دستگاه عصبی مرکزی پستانداران، پیش برد بقای نورون های کوچک طناب نخاعی پس از ایجاد ضایعه نخاعی و رشد اکسون نورون حرکتی قشر نخاع، افزایش بقای سلولهای غده عصبی شبکیه آسیب دیده در رت، افزایش توانایی نورون های حرکتی برای تقویت فیبرهای ماهیچه اسکلتی در محیط کشت طناب نخاعی رت و ماهیچه ی انسانی، (Yin et al., 2001)تکوین و بلوغ گیرنده‌ی مکانیکی انتهای رافینی لیگامنت‌های اطراف دندانی(Maruyama et al., 2005))، بقای فیبروبلاست های بیان کننده ی TrkB (Fandl et al., 1994) پیشبرد بلوغ و تکوین هسته‌ی اووسیت وخروج جسم قطبی میوز I اووسیت موش در مایع فولیکولی تخمدان (Seifer et al., 2002) وترشح بزاق توسط سلول های جامی شکل (Rios et al., 2007).

1-1-4- پردازش[5] نوروتروفین ها

نوروتروفین ها توسط ریبوزوم های قرار گرفته برروی شبکه اندوپلاسمی به صورت پری-پرو نوروتروفین های غنی از اسیدآمینه های بازی و با طول حدود 240-260 امینواسید کد شده و پس از آن برای تولید فرم بالغ، پردازش می شوند. به همین منظور به شبکه اندو پلاسمی منتقل شده و پپتید نشانه ی آن ها برای تولید پروپپتید در شبکه اندوپلاستی جدا می شود(Lanave et al., 2007; McDonald and Chao, 1995). پرونروتروفین ها در وزیکول های انتقالی از شبکه اندوپلاسمی به گلژی منتقل می شوند. پرودمین انتهای امینی در منطقه ترانس گلژی یا در وزیکول های ترشحی نابالغ توسط پروپروتئین کانورتاز[6] (تبدیل کننده) برای تولید حالت بالغ و فعال زیستی ملکول ، حذف می شود. فعالیت این سرین پروتئاز بستگی به غلظت کلسیم در گستره ی 10µM و pH 5 تا 7 دارد که این شرایط در شبکه ترانس گلژی و گرانول های ترشحی وجود دارد. (Hibbert et al., 2003; Lessmann et al., 2003).

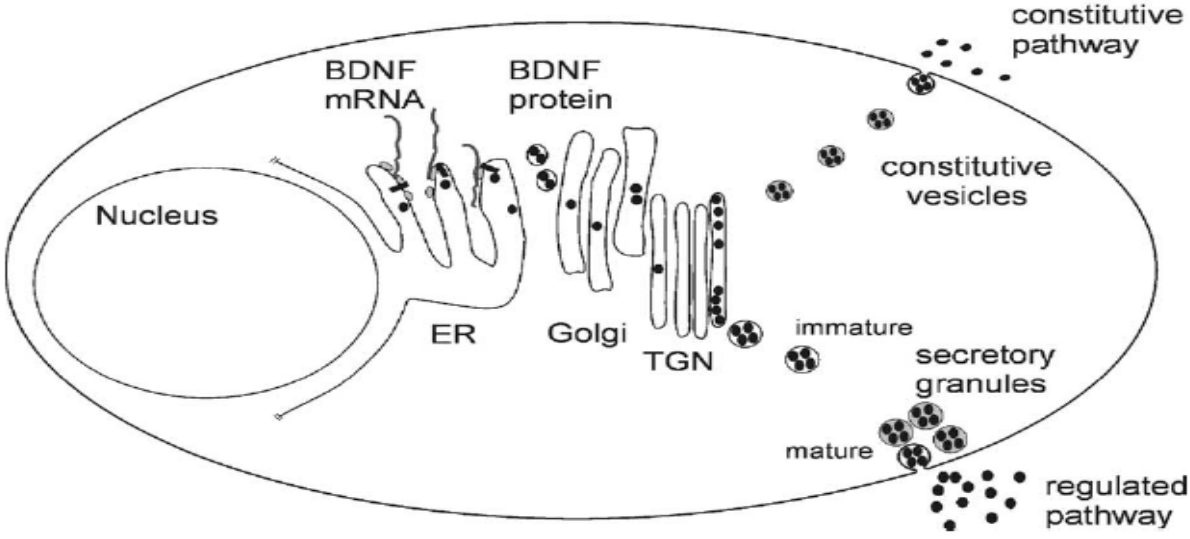
[5] Processing
[6] Convertase

پردازش نوروتروفین ها علاوه بر شکاف پرو دمین برای تولید نوروتروفین بالغ، شامل گلیکوزیلاسیون مربوط به انتهای امینی در پرودمین و سولفاته شدن الیگوساکارید های انتهای امین نیز می شود. گلیکوزیلاسیون باعث خروج پرو نوروتروفین ها از شبکه اندوپلاسمی و فرار پرونوروتروفین از تجزیه داخل سلولی می شود (Lessmann et al., 2003)

1-1-5- مسیر ترشحی نوروتروفین ها

نوروتروفین های مختلف بسته به نوع سلول در مسیرهای مختلف ترشحی بدون وقفه[7] یا تنظیمی[8] قرار می گیرند(Reichard, 2006). در مسیر بیون وقفه، پروتئین ها به دنبال شکافت، سریعاً ترشح می شوند. در حالیکه پروتئین ها در مسیر تنظیمی داخل وزیکول های ترشحی ذخیره شده و به صورت وابسته به فعالیت و یا در پاسخ به عوامل خارج سلولی ازاد می شوند. این مسیرها در شکل 1-3- نشان داده شده اند.

گرانول های ترشحی مسیر بدون وقفه کوچکند (قطر 50 تا 100 نانومتر) و به پیرامون سلول تر شح می شوند و می توانند برای ازاد سازی ترکیبات خود با غشای پلاسمایی ترکیب شوند. این مسیر در تمام سلول هایافت می شود و به کلسیم وابسته نیست. وزیکول های مسیر تنظیمی بزرگترند (قطر 100تا300 نانومتر). از ناحیه ترانس گلژی جوانه می زنند. تلقیح انها به غشای پلاسمای وابسته به کلسیم است (Lessmann et al., 2003). در سلول های AtT-20 و نورون های هیپوکمب BDNF درمسیر تنظیمی و NGF وNT3 در مسیر بدون وقفه، ترشح می شوند.



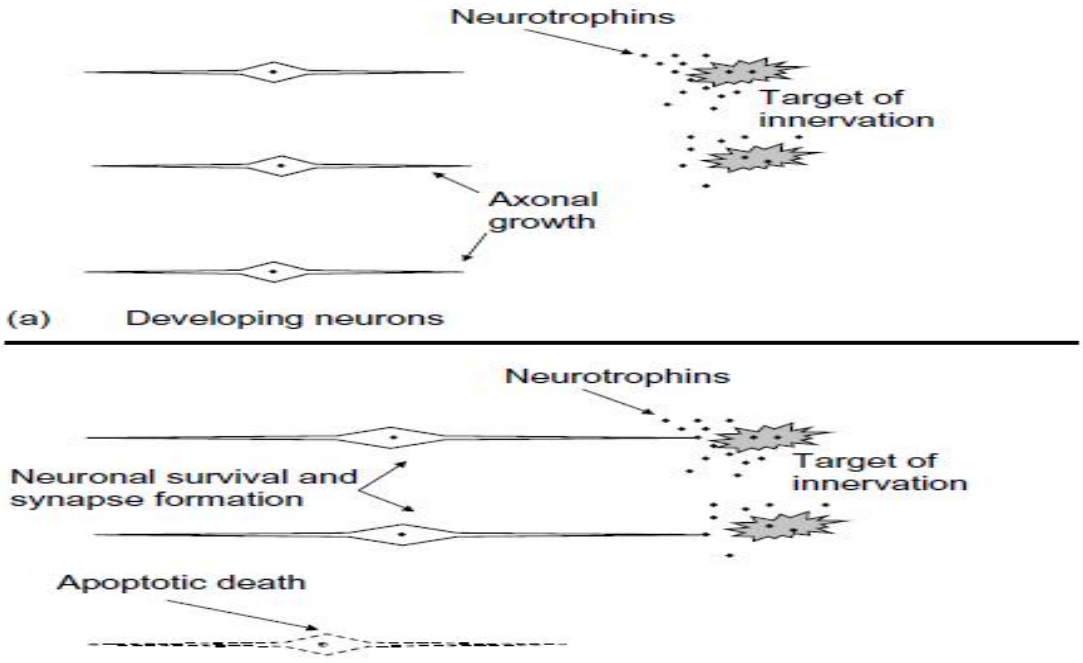
شکل 1-3- مسیرهای ترشحی نوروتروفین ها (Lessmann et al., 2003).

[7] Constitutive pathway
[8] Regulated pathway

1-1-6- فرضیه نوروتروفیک

روشی برای تاسیس شبکه نورونی نهایی که به دستگاه عصبی اجازه پردازش پیام عصبی و ایجاد پاسخ از محدوده اندوکرین و حرکتی تا احساس خود آگاهی را می دهد، بستگی به اصول فرضیه نوروتروفیک دارد. فرضیه نورو ترونیک می گوید که رقابت برای فاکتور های تروفیک مشتق از هدف، مکانیسمی برای تقویت انواع بافتهای هدف در طول تکوین دستگاه عصبی فراهم می کند. در طول تکوین دستگاه عصبی، نورونها ی زیادی تولید می شوند. بقا و تمایز تعداد خاصی از نورنها از طریق فاکتورهای نورتروفیک مشتق از هدف تامین می شود . همان طور که شکل 1-4- نشان می دهد، نورونهای تکوین یافته ای که قادر به ایجاد ارتباط با سلولهای هدف خود نیستند از فاکتورهای نروترونیک لازم محروم شده ونهایتاً از بین می روند و آن دسته از نورونهایی که ارتباطات لازم را ایجاد می کنند باقی مانده و به سمت تمایزو بلوغ می روند (Lipton, 1995; Polo, 2010). فرضیه نوروتروفیک بر اساس انتقال برگشتی نوروتروفین ها از انتهای عصب با دسترسی به بافت ترشح کننده فاکتور رشد است. این اصول بیشتر مطابق با NGF می باشد که در بقای نورونی دخیل است. شواهدی نیز مبنی بر انتقال رفتی در BDNF که بیشتر در پلاستی سیتی سیناپسی نقش دارد دیده شده است سنتر نوروتروفین ها در بافتهایی انجام می گیرد که هدف تقویت هستند نه در نورون هایی که آن ها را تقویت می کنند و گیرنده های آنها بر روی نورونهای تقویت شونده هستند و در بافتهای هدف نیستند.

کاهش بیان نوروتروفین ها یا گیرنده هایشان و یا ایجاد وقفه در انتقال بر گشتی نوروتروفین ها باعث مرگ نورون ها می شود که می توان با کاربرد خارجی فاکتور ها ی رشد مناسب از این اتفاق جلوگیری کرد(Polo, 2010).



شکل 1-4- فرضیه نوروتروفیک (Polo, 2010).