

انتقال cDNA گیرنده فعال کننده پراکسیزومی نوع گاما ۱ موشی به داخل سلولهای فیروبلاست گاوی و بررسی بیان درون سلولی آن به کمک پروتئین گزارشگر فلورسنت سبز

ثریا قاسمی^{۱*}، کامران قائدی^۲، محمد حسین نصر اصفهانی^۲، ابوالقاسم اسماعیلی^۳، سمیه تنهایی^۴، فرزانه ربیعی^۵، خدیجه کربلایی^۶، حسین بهاروند^۷

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی جایگیری PPAR γ 1 cDNA موش در پلاسمید بیانی pEGFP-C1 در هسته سلول مورد مطالعه (فیروبلاست گاوی) با استفاده از رد یابی مارکر فلورسنتی سبز EGFP می باشد. برای بررسی الگوی بیان و جهت گیری PPAR γ 1 cDNA درون هسته سلولهای فیروبلاست گاوی، پس از تکثیر و کلون نمودن آن در پلاسمید بیانی مناسب pEGFP-C1 سلولها با ۲,۴ μ g پلاسمید و ۶ μ l Lipofectamine 2000 ترانسفکت شدند. مارکر EGFP که به صورت فیوز شده با PPAR γ 1 cDNA بیان می شود، برای رد یابی استفاده شد. با ترانسفکت نمودن سلولهای فیروبلاست گاوی، پروتئین حاصله عمدتاً وارد هسته ها گردید. همان طور که انتظار می رفت، cDNA ژن PPAR γ 1 موشی کلون گردیده متصل به ژن گزارشگر فلورسنت سبز با موفقیت بیان شده و پروتئین حاصله عمدتاً به داخل هسته سلولهای مورد مطالعه، وارد شده است. بنابراین می توان از پلاسمید نو ترکیب حاصله برای مطالعات بیشتر جهت بررسی وظیفه ژن PPAR γ 1 بهره برد و اتصال EGFP به PPAR γ 1 مانع از جهت یابی داخل سلولی PPAR γ 1 نمی شود.

واژگان کلیدی: PPAR γ 1، فیروبلاست، کلونینگ، ترانسفکشن

مقدمه

گیرنده های پراکسیزومها^۱ (PPARs) فاکتورهای رونویسی فعال شونده توسط لیگاندها هستند که متعلق به خانواده گیرنده های هسته ای هستند (۱). این گیرنده ها نخستین بار در سال ۱۹۹۰، از سلولهای کبد موش تخلیص شدند. اولین نقشی که برای این گیرنده ها شناسایی شد،

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
 - ۲- پژوهشگر رویان اصفهان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی
 - ۳- دانشگاه اصفهان
 - ۴- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، پژوهشگر رویان اصفهان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی
 - ۵- دانش آموخته زیست شناسی پژوهشگر رویان اصفهان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی
 - ۶- دانش آموخته کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، پژوهشگر رویان اصفهان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی
 - ۷- پژوهشگر رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی تهران
- *-نویسنده مسئول sorayya.ghasemi@yahoo.com

1. Peroxisome proliferators activated-receptors

کلسیم فسفات است که اولین بار در سال ۱۹۷۳ توسط Graham and van der Eb کشف شد (۷). یکی از موثرترین تکنیک‌ها در ترانسفکشن استفاده از لیپوزوم^۴ است. لیپوزوم‌ها اجسام کوچک دارای غشاء می‌باشند که از بعضی جهات شبیه غشاء سلولند، و قادرند با غشاء سلولی ادغام شوند و DNA را به درون سلول رها کنند که این روش به دلیل حساسیت بالای سلولی، برای ترانسفکشن سلول‌های یوکاریوتی بسیار رایج است. از این رو می‌توان پس از کلون نمودن ژن مورد نظر در وکتور بیان شونده در سلول‌های یوکاریوتی، توسط روش لیپوفکشن آن را وارد سلول نمود. روش‌های گوناگونی نیز برای رد یابی و مشاهده DNA وارد شونده به سلول وجود دارد. استفاده از پلاسمیدهای دارای مارکرهای قابل رد یابی مانند pEGFP-C1 که با داشتن مارکر فلورسنتی EGFP، مکان یابی آن را در سلول امکان پذیر می‌سازد استفاده شد. هدف از این تحقیق، وارد نمودن پلاسمید pEGFP-C1 حامل PPAR γ 1 cDNA به سلول‌های فیروبلاست برای بررسی نحوه جای گیری پروتئین بیان شده از این پلاسمید است.

مواد و روش کار

۱- پلاسمید نو ترکیب pEGFP-C1 / PPAR γ 1

در این تحقیق از پلاسمید نو ترکیب PPAR γ 1 / pEGFP-C1 استفاده گردید. بدین صورت که پس از تکثیر PPAR γ 1 cDNA با روش SOE-PCR^۵، که در همین آزمایشگاه انجام گرفته بود. این قطعه در پلاسمید بیان شونده مناسب برای بیان در سلول‌های یوکاریوتی کلون گردیده که پس از توالی یابی برای اطمینان از عدم جهش و دارا بودن چهارچوب خوانش صحیح آن آماده برای ترانسفکشن گردید (۸).

افزایش تعداد پراکسیزوم‌ها در سلول بود. با مطالعات بعدی مشخص شد که این گیرنده‌ها عملکردهای گسترده‌تری دارند و در فرایندهای مختلف سلولی، مثل رشد و تمایز سلول‌ها، مرگ سلولی (آپوپتوز)، تنظیم پاسخ ایمنی و تعادل انرژی نقش دارند. توزیع PPARs در بافت‌های مختلف، متفاوت است و هر یک به لیگاندهای ویژه‌ای متصل می‌شود. لیگاندهای طبیعی و سنتتیک مختلفی برای این گیرنده شناسایی شده‌اند. مانند پروستاگلاندین‌ها و لکوترین‌ها هستند (۲). سه نوع PPAR (α , β/δ , γ)، در انواعی از موجودات شناخته شده است. با استفاده از آزمایش نورترن بلات^۲، مشخص شده است که، PPAR γ دارای دو ایزوفرم γ 1, γ 2 است. در موش این ژن، در بافت چربی، کبد، کلیه و قلب به میزان زیاد و در شش، بیضه‌ها، مغز، ماهیچه اسکلتی به میزان کمی بیان می‌شود (۳، ۴). 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 می‌گیرد (۴، ۵). اخیراً مشخص شده است، با وجود بیان کم PPAR γ ‌ها در مغز موش بالغ، در مغز جنین موش و سلول‌های بنیادی عصبی^۳ بیان بالایی دارد (۶). همچنین، PPAR γ ‌ها در تنظیم تمایز ماکروفاژها، نقش دارد. یکی از بهترین استراتژی‌هایی که امروزه برای بررسی نقش و فعالیت محصول ژن‌ها، بکار می‌رود، کلون نمودن ژن‌ها در وکتورهای بیانی مناسب و سپس ترانسفکشن نمودن آن‌ها به سلول‌های مد نظر برای مطالعه است. روش‌های مختلفی برای وارد کردن DNA به درون سلول‌های یوکاریوتی (ترانسفکشن) وجود دارد. مواد مختلفی که برای انجام ترانسفکشن استفاده می‌شوند، می‌توان به سه گروه: پلیمرهای کاتیونی، لیپوزوم‌ها و ذرات نانو تقسیم‌بندی کرد. ابتدایی‌ترین روش، ترانسفکشن با استفاده از

4. Liposome
5. Splicing by overlap extention -PCR

2. Northern blot
3. Neural stem cells (NSCs)

دستورالعمل لیپوفکتامین ۲۰۰۰ برای هر چاهک از دیش‌های ۲۴ خانه به روش زیر انجام گردید:
یک میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ و ۲۴ میکرولیتر محلول Opt-MEMI (Gibco)، به ازای هر چاهک با هم مخلوط شدند و ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. ۰/۴ میکروگرم DNA پلاسمیدی با محلول Opt-MEMI به حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط شد. محلول‌های مرحله ۱ و ۲ با هم مخلوط شده و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند تا واکنش DNA و لیپوفکتامین کامل شده و کمپلکس‌های DNA و لیپوفکتامین، تشکیل شود. آن‌گاه محیط اختصاصی سلول‌ها حذف و سلول‌ها با محلول Opt-MEMI شستشو داده شدند. پس از شستشو و حذف محلول Opt-MEMI، مجدداً ۲۵۰ میکرولیتر Opt-MEMI روی سطح سلول‌ها در هر چاهک اضافه شده و ۵۰ میکرولیتر محلول DNA-لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به هر چاهک افزوده شد و سعی شد به آرامی و به گونه‌ای که سلول‌ها کنده نشوند، با استفاده از نوک سمپلر در تمام سطح چاهک پخش شود. پس از ۶ ساعت انکوباسیون محلول ترانسفکشن با سلول‌ها، این محلول از سطح سلول‌ها حذف و محیط کشت اختصاصی هر سلول به آن افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ قرار گرفتند.

۴- آماده سازی سلول‌ها برای مشاهده

ابتدا محیط سلول‌ها حذف و سلول‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد. سپس سلول‌ها جهت تثبیت در پارافرم آلدئید ۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفتند. آنگاه محلول پارافرمالدئید از سطح سلول‌ها حذف و دو بار شستشو با PBS انجام شد. در آخرین مرحله لامل از کف خانه‌های دیش برداشته شد و با چسب Entellan (Merck) روی لام چسبانده شد و پس از خشک شدن، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX5) مشاهده شدند.

۲- آماده سازی سلول‌های فیبروبلاست گاو جهت

انجام واکنش ترانسفکشن

الف) ذوب سلول‌های فیبروبلاست

برای ذوب سلولی، ابتدا در یک فلاسک T25 استریل، ۵ میلی لیتر محیط کشت گرم شده (DMEM- (FCS 10% (Gibco)، در شرایط استریل و زیر هود ریخته شد. به کمک پنس، ویال انجماد که حاوی سلول‌های فیبروبلاست گاوی بود را از تانک نیتروژن خارج نموده و در بن‌ماری ۳۷ °C به آرامی تکان داده تا سلول‌ها از حالت انجماد خارج گردیدند. آن‌گاه محتویات ویال را به فلاسک حاوی محیط (DMEM- (FCS 10%)، انتقال داده شد. به آرامی فلاسک را کمی تکان داده تا سلول‌ها یکنواخت در تمام محیط پراکنده شدند. پس از مشاهده فلاسک در زیر میکروسکوپ نوری و بررسی توزیع سلولی در آن، فلاسک به انکوباتور ۳۷ °C، ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ منتقل شد.

ب) پاساژ و شمارش سلولی جهت ترانسفکشن

به منظور ترانسفکشن سلول‌ها آن‌ها را پاساژ داده بدین نحو که تعداد ۷۵۰۰ cell/cm² به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها ۷۰٪ کف دیش را پر کرده و آماده ترانسفکشن شدند. ضمناً وضعیت سلول‌ها از جهت مورفولوژی، تعداد و عدم آلودگی زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

۳- ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب PPAR γ 1cDNA/

pEGFP-C1 با روش لیپوفکشن به درون سلول‌های

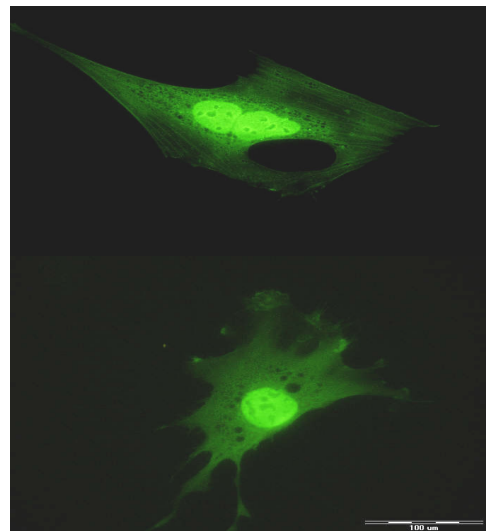
فیبروبلاست گاو

پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت سلول‌ها در دیش‌های ۲۴ خانه و پر شدن نزدیک به ۷۰٪ از سطح چاهک‌ها، ترانسفکشن با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) انجام شد.

نتایج

نتایج ردیابی مارکر فلورسانتی در سلول‌های فیبروبلاستی ترانسفکت شده

با بررسی میزان فلورسانسی نمونه‌ها مشخص گردید که بیش از نیمی از سلول‌ها ترانسفکت شده و رنگ سبزی را از خود ساطع می‌کردند. در این مطالعه انتظار می‌رفت که با قرار گرفتن ژن PPAR γ 1 و ژن EGFP در یک قالب خوانشی، بتوان آن را ردیابی کرد. از آنجا که در انتهای آمینی پروتئین PPAR γ 1 مارکر EGFP وجود دارد و با توجه به اینکه PPAR γ 1 فاکتوری رونویسی، و در واقع پروتئینی هسته ای را کد می‌کند، ورود پروتئین بیان شده از این وکتور عمدتاً به هسته به کمک ردیابی رنگ سبز آن، دلیل بر درست بودن عملکرد پلاسمید و قطعه وارد شده در آن است. در این تحقیق برای بررسی این موضوع، از سلول‌های فیبروبلاست گاوی استفاده گردید. مطالعات انجام شده بر روی EGFP- mouse PPAR γ 1 در سلول‌های فیبروبلاست گاوی، نشان داد که ورود این پروتئین



شکل شماره ۱: نتایج مشاهده شدن سلول‌های ترانسفکت شده با استفاده از EGFP به عنوان نشانگر. سلول‌های فیبروبلاست گاوی ترانسفکت شده با پلاسمید pEGFP-C1-PPAR γ 1، وجود ذرات سبز تر درشت وسط نشان‌دهنده جایگاه هسته‌ای پروتئین PPAR γ 1 در سلول است. بزرگنمایی در این جا ۱۰۰ نانومتر است.

به درون هسته نمایانگر جهت گبرب صحیح آن در سلول‌های متفاوت از جتس موش می‌باشد. این امر موید مشابه بودن فعالیت و جهت‌یابی صحیح پروتئین PPAR γ 1 در سیستم‌های سلولی پستانداران است (شکل شماره ۱).

بحث

در این مطالعه PPAR γ 1cDNA موشی که توسط ما کلون گردیده بود مورد استفاده قرار گرفت (۸). ژن PPAR γ 1 بیان بسیار بالایی در بافت چربی داشته و نقش مهمی را در در تنظیم اعمال حیاتی سلول‌های چربی اعمال می‌کند (۹). از آنجا که به منظور بررسی نقش فیزیولوژیک این ژن، PPAR γ 1cDNA بصورت یک ساختار شیمیر در پایین دست ژن نشانگر EGFP قرار گرفته بود میتوانیم پس از انتقال آن به سلول‌های جانوری و تولید پروتئین نوترکیب EGFP - PPAR γ 1 به راحتی با استفاده از فلورسانسی ایجاد شده به مطالعه اثرات فیزیولوژیک آن پی برد. البته به منظور بررسی کارایی ساختار شیمیری ایجاد شده در این مطالعه پلاسمید نوترکیب حاصله به داخل سلول‌های فیبروبلاست گاوی انتقال داده شده و جهت گیری داخل سلولی پروتئین نوترکیب حاصله ارزیابی گردید. همانطور که در بخش نتایج آمده است بدنبال ترانسفکشن سازه مذکور غالباً هسته‌های سلول‌های ترانسفکت شده رنگ سبز فلورسانس را به میزان بالایی و بیشتر از سیتوپلاسم ساطع نمودند که بیانگر میزان پراکنش EGFP - PPAR γ 1 در سلول‌های مورد مطالعه بود. نتایج مذکور موید نتایج بدست آمده قبلی انتقال سازه مذکور در سلول‌های COS-1 و هپاتومای موشی بود (۱۰ و ۱۱). این نتایج نشان داد که سازه ساخته شده توسط تیم مطالعاتی ما کار آیی لازم را جهت مطالعات بعدی دارد و بیانگر این تکتک است که بدنبال ساخته شدن پروتئین نوترکیب حاصله در سیتوزول از آنجاکه محل فعالیت آن در هسته میباشد به داخل هسته

منابع

- 1- Akiyama, T.E., Baumann, C.T., Sakai, S., Hager, G.L., Gonzalez, F.J. (2002): Selective intranuclear redistribution of PPAR isoforms by RXR α . *Molecular Endocrinology*, 16, 707–721.
- 2- Berger, J., Patel, H.V., Woods, J., Hayes, N.S., Parent, S.A., Clemas, J., Leibowitz, M.D., Elbrecht, A., Rachubinski, R.A., Capone, J.P., Moller, D.E. (2000): A PPAR γ mutant serves as a dominant negative inhibitor of PPAR signaling and is localized in the nucleus. *Molecular Cell Endocrinology*. 162, 7–67.
- 3- Bishop-Bailey, D., Hla, T. (1999): Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 17042–17048.
- 4- Copeland, N., Jenkins, N., and Court, D. (2001): Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nature Review Genetics* 2, 769–779.
- 5- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M., Staels, B., Vidal, H. and Auwerx, J. (1997): The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 18779–18789.
- 6- Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W. (2006): From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in lipid Research*. 45:120-135.
- 7- Ghasemi, S., Ghaedi, K., Nasr-Esfahani, M.H., Esmaeili, A., Tanhaie,

ها انتقال می‌یابد. اگر چه مطالعات بر روی سلولهای پیش ساز چربی از نوع 3T3-L1 مشخص نموده است که بدنبال ترانسفکشن این سلول ها PPAR γ 1 عمدتاً در ساختارهای دانه‌دار پیرامون هسته‌ای جهت یابی می‌گردد (۱۳ و ۱۲). در مطالعه حاضر به نتایج مشابهی دست نیافتیم که علت این امر شاید به دلیل استفاده از لاین سلولی متفاوتی بوده است. در نهایت این مطالعه بیانگر کارآیی سازه ساخته شده و جهت گیری مناسب پروتئین نو ترکیب حاصله در سلولهای مورد مطالعه بود.

- Baharvand, H. (2009): Cloning of mouse PPAR γ 1 cDNA in pEGFP-C1 expression vector. University of Isfahan Biology Journal. Submitted.
- 8- Mangelsdorf, DJ, T., Beato, M., Herrlich, P., Schutz G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, E., Chambon, P., Evans, RM. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83:835-839.
- 9- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J.G., Thomazy, V.A., Evans, R.M. (1998): PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93, 241-252.
- 10- Vidal-Puig, A., Considine, R., Jimenez-Linan, M., Werman, A., Pories, W., Caro, J. and Flier, J. (1997): Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. *The Journal of clinical investigation*. 99, 2416-2422.
- 11- Wada, K., Nakajima, A., Katayama, K., Kudo, C., Shibuya, A., Kubota, N., Terauchi, Y., Tachibana, M., Miyoshi, H., Kamisaki, Y., Mayumi, T., Kadowaki, T. and Blumberg, R. (2006): Peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 12673-12681.
- 12- Woods, J.W., Tanenb, M., Figueroa, D.J., Biswas, C., Zychband, E., Moller, D.E., Austinc, C.P., Berger, J.P. (2003): Localization of PPAR γ in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. *Brain Research*. 975, 10-21.
- 13- Zhu, Y., Alvares, K., Huang, Q., Rao, M. and Reddy, J. (1993): Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 26817-26820.
- S., Rabeii, F., Karbalaii, K., and