مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی

فاطمه توحیدی نژاد[1]، محمدرضا محمدآبادی*[2]، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه[2]، عذرا نجمی نوری[3]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3] دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰٤/۳۱

چکیده

ژن Rheb تحت عنوان ژن اولیه فوری[1] (IEG) برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ شناسایی شد که دارای ۱۸٤ اسید آمینه و وزن ملکولی ۲۰٤۹۷ دالتون است. Rheb متعلق به خانواده Ras است که چارچوب کربوکسی ترمینال CAAX را کد می‌نماید که نشان می‌دهد پروتئین ممکن است تحت فارنسیلاسیون بعد از ترجمه[2] قرار گیرد. Rheb یک فاکتور تنظیم کننده بالادست مسیر سیگنال‌دهی mTOR است و Rheb-GTP می‌تواند mTOR را فعال کند که القا کننده قوی فسفوریلاسیون S6K1 اندوژنوس در رزیدوهای ترئونین ۳۸۹، ترئونین ٤۲۱ و سرین ٤۲٤ می‌باشد. بیان بیش از حد Rheb رشد سلولی را تحریک می‌کند، در حالی-که توقف بیان Rheb سنتز پروتئین و رشد سلولی را مهار می‌کند. بیان بیش از حد Rheb-GAP فعالیت mTOR را مهار می‌کند و ناحیه برش عرضی فیبر را در ماهیچه‌های اسکلتی پستانداران کاهش می‌دهد. بین میواستاتین و مسیرهای سیگنال‌دهی mTOR در ماهیچه‌های اسکلتی پستانداران اثرمتقابل وجود دارد. نمونه-ها از بافت‌های مغز، قلب، شش، پانکراس، طحال، کلیه، کبد و بیضه مربوط به بز کرکی راینی تهیه شدند. RNA استخراج شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNA بررسی و سنتز cDNA انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و با نرم افزار Gene Tools سطوح مختلف بیان در بافت های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت کلیه و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان می دهد که بیان ژن Rheb در بز کرکی رائینی در بین بافت های مختلف تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد دارد. لذا می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالا ژن Rheb در سلول های بز نقش دارد و باید در تحقیقات بعدی این نقش(ها) شناسایی شوند.

کلمات کلیدی: *ژن Rheb، بز کرکی راینی، بیان، بافت.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا محمدآبادی تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳٤

Email: mmohammadabadi@yahoo.ca

[1] immediate early gene (IEG)

[2] post-translational farnesylation

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

با توجه به رشد روز افزون جمعیت جهان استفاده از روش‌های نوین برای[۶] تامین نیازهای مختلف این جمعیت عظیم ضروری به نظر می رسد. در کشورهای توسعه یافته پرورش دام به روش‌های علمی جایگزین روش‌های سنتی گردیده است و این امر توانسته تحول بزرگی در تولید محصولات دامی ایجاد کند. در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند (Ahmadikhah, 2008). ماده ژنتیکی[۱] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی-شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد. بیان ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود. پروتئین‌های Ras[۲] تنظیم کننده واکنش‌های بیوشیمیایی مختلفی در داخل سلول‌ها هستند و از جمله در تکثیر سلولی و تمایز، انتقال وزیکولی و پلاریته (قطبیت) سلولی نقش دارند (Yamagata *et al*. 1994). ژن Rheb (همولوگ Ras غنی شده در مغز[۳]) در یوکاریوت‌ها بسیار حفاظت شده است و در همه آنها از مخمر تا پستانداران وجود دارد (Urano *et al*. 2001). این ژن GTPase کوچکی را کد می کند که ارتباط نزدیکی با RAS دارد که یا در حالت فعال (باند شده به GTP) و یا در حالت غیر فعال (باند شده به GDP)، وجود دارد (Clark *et al*. 1997; Im *et al*. 2002). ژن Rheb تحت عنوان ژن اولیه فوری[۴] (IEG) برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ شناسایی شد که دارای ۱۸٤ اسید آمینه و وزن ملکولی ۲۰٤۹۷ دالتون است (Yamagata *et al*. 1994). Rheb متعلق به خانواده Ras است که باکس کربوکسی ترمینال CAAX را کد می‌نماید و ممکن است پروتئین تحت فارنسیلاسیون بعد از ترجمه[۵] قرار گیرد (Hancock *et al*. 1989; Kinsella *et al*.

[1] DNA

[2] Rat sarcoma **منعکس کننده اولین اعضای خانواده پروتئینی است که کشف شده و نیز به خانواده‌ای از ژن‌ها اشاره دارد که این پروتئین‌ها را کد می کنند.**

[3] Ras homolog enriched in brain

[4] immediate early gene (IEG)

[5] post-translational farnesylation

Archive of SID

www.SID.ir

1991; Knox 1995). اما، نکته ویژه این است که Rheb یک آرژنین به جای گلایسین در مکان ۱۲ دارد که در خانواده Ras حفاظت شده است (Lau and Nathans 1987; Saffen *et al.* 1988). مشابه دیگر پروتئین‌های Ras، نواحی با همولوژی بالا بین Rheb و خانواده Ras وجود دارد که متناظر با ۵ باکس Ras دخیل در باند شدن GTP هستند و شامل باکس G1 تا G5 هستند (Bourne *et al.* 1991). بدیهی است که Rheb یک گوانوزین تری فسفات (GTPase) کوچک شبیه Ras است که بین فرم فعال باند شده به GTP و فرم غیرفعال باند شده به GDP نوسان می‌کند (Yamagata *et al.* 1994; Aspuria and Tamanoi 2004). Rheb یک فاکتور تنظیم کننده بالادست مسیر سیگنال دهی mTOR[1] (هدف متازوایی راپامایسین) است و Rheb-GTP می‌تواند mTOR را فعال کند که القا کننده قوی فسفوریلاسیون S6K1[2] اندوژنوس در رزیدوهای ترئونین ۳۸۹، ترئونین ٤٢١، و سرین ٤٢٤ می‌باشد (Castro *et al.* 2003; Sarbassov *et al.* 2005; Sato *et al.* 2008). mTOR یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین است که با Rheb همبسته است. تنظیم کننده بالادست Rheb کمپلکس TSC2/TSC1 است که یک پروتئین فعال کننده TPase (GAP) است و مسیر سیگنال دهی mTOR را به وسیله تحریک هیدرولیز GTP فرم فعال Rheb (Rheb-GTP) به فرم غیر فعال Rheb (Rheb-GDP) مهار می‌کند (Tee *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2003; Hay and Sonenberg 2004). Rheb یک کیناز کلیدی متصل کننده کمپلکس TSC2/TSC1 و mTOR است. شواهد نشان می‌دهد که Rheb از طریق باند کردن مستقیم Rheb-GTP به mTOR برای پیشرفت فعال سازی mTOR تنظیم mTOR را انجام می‌دهد (Long *et al.* 2005). mTOR کنترل کننده مرکزی رشد سلول است، برای رشد و توسعه اولیه سلول ضروری است، حافظه و پیری را در بزرگسالان تحت تأثیر قرار می‌دهد و در سیگنال دهی آن فاکتورهای رشد، مواد مغذی، انرژی و استرس نقش دارند. محققین دیگر نشان داده‌اند که FKBP38 می‌تواند به mTOR باند شود تا فعالیت آن را مهار کند و Rheb-GTP به طور مستقیم با FKBP38 اثرات متقابل ایجاد می‌کند تا از همبستگی FKBP38 با mTOR جلوگیری نماید (Bai *et al.* 2007; Ma *et al.* 2008). اما، خصوصیات بیوشیمیایی جامع و گسترده اثرمتقابل Rheb/FKBP38 با استفاده از سه ارزیابی در شرایط آزمایشگاهی[3] مختلف مشخص نکرده است که بین Rheb و FKBP38 اثرمتقابل وجود دارد (Katharina *et al.* 2009). بنابراین مکانیسم اثر متقابل بین Rheb و FKBP38 هنوز تحت شک و تردید است و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

Rheb به صورت آنتاگونیست TSC (کمپلکس اسکلروزیس غده‌ای[4])، که فعال کننده فعالیت Rheb-GTPase، یعنی Rheb-GAP

[1] metazoan target of rapamycin
[2] p70S6 kinase
[3] *in vitro*
[4] tuberous sclerosis complex

Archive of SID

www.SID.ir

(پروتئین فعال کننده GTPase)[1] است عمل می کند (شکل ١). سلول‌هایی که فعالیت TSC-Rheb-GAP آنها از بین رفته است فعال سازی ساختاری سیگنال دهی TORC1[2] (کمپلکس هدف راپامایسین ١) را نشان می‌دهند. مکانیسم‌های عمل اسیدهای آمینه در کنترل سیگنال دهی TOR و مکانیسم آن در کنترل عمل Rheb هنوز به خوبی درک نشده‌اند. غیرفعال سازی سیگنال دهی TORC1 محروم از مواد مغذی می‌تواند به وسیله بیان بیش از حد Rheb نوترکیب محفوظ شود. Rheb به عنوان تنظیم کننده مثبت سیگنال دهی TOR به وسیله باند شدن به لوب آمینوترمینال دامین کاتالیتیک mTOR عمل می‌کند. فعال سازی ساختاری Rheb ترانسفورماسیون آنکوژنیک را از طریق پروتئین TOR القا می‌کند (Jiang and Vogt 2008). Rheb همچنین به طور مستقل از TOR در تنظیم جنبه‌های مختلف عمل سلولی نقش ایفا می-کند. در پژوهشی Rosel *et al.* (2012) نشان دادند که Rheb فاگوسیتوز را در مسیر وابسته به TORC2 و مسیر مستقل از AKT (پروتئین کیناز B)[3] در این سیستم مدل مهار می‌کند.

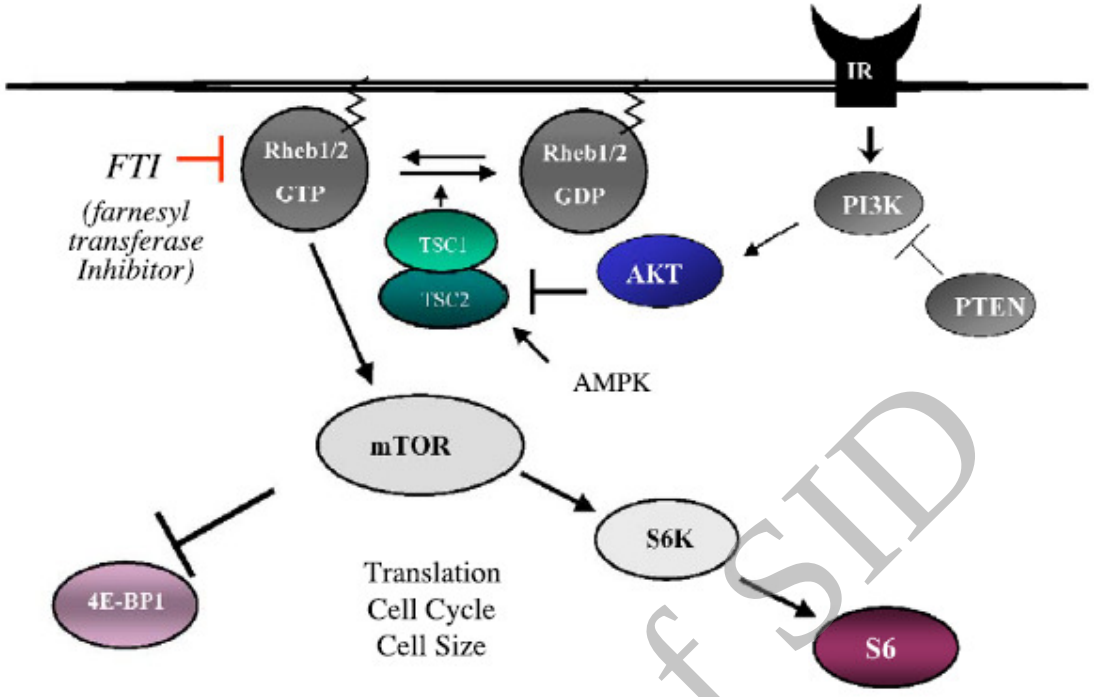
ژن کد کننده Rheb در بز bp ٥٥٥ طول دارد. وزن مولکولی پیش بینی شده برای پروتئین ویرایش نشده آن ٢٠٣٥٨ دالتون و نقطه ایزوالکتریک تخمین زده شده (PI) برابر ٦/٢٧ است. اسیدهای آمینه اصلی شامل ١٠/٣ درصد سرین، ٩/٢ درصد ایزولوسین ، ٩/٢ درصد والین ، ٧/٦ درصد لیزین و ٧/٦ درصد لوسین هستند. Rheb شامل ناحیه‌ای از Ras است که از اسیدآمینه شماره ٤ شروع شده و در اسیدآمینه شماره ١٧٠ به پایان می رسد.

این ژن شامل جابجایی منطقه I از اسیدآمینه ٣٦ تا ٤٣ و جابجایی منطقه II از اسیدآمینه ٦٢ تا ٨٠ می باشد. آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داده است که ژن Rheb یک جایگاه N-glycosylation، سه جایگاه فسفریل دارکردن پروتئین کیناز C، دو جایگاه فسفریل دار کردن کیناز کازئین II، چهار سیگنال هدف گیرنده انتهای C میکروبادی‌ها[4]، دو جایگاه اتصال ATP/GTP موتیف A (P-Loop) و یک جایگاه اتصال گروه preny 1 (باکس CAAX) دارد (Zheng *et al.*, 2011). فعالیت Rheb توسط فاکتورهای رشد، قابلیت دسترسی به مواد مغذی و ATP سلولی و سطح اکسیژن تنظیم می شود (Buerger *et al.*, 2006).

[1] GTPase-activating protein
[2] The target of rapamycin complex 1
[3] Protein kinase B
[4] Microbodies C-terminal targeting signal

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- محل Rheb در قسمتی از مسیر سیگنالی Insulin/mTOR/S6K در سلول های پستانداران (Yamagata *et al.*, 1994).

Figre 1- Rheb position in part of Insulin/mTOR/S6K signaling pathway in mammalian cells (Yamagata *et al.*, 1994).

غیر فعال شدن موتاسیونی ژن Rheb، باعث ایجاد سلول هایی با سایز کوچک می‌شود و از طرف دیگر بیان بالای ژن Rheb باعث افزایش عمده سایز سلولی می‌شود (Long *et al.*, 2007). بیان بیش از حد Rheb رشد سلولی را تحریک می‌کند، در حالی‌که توقف بیان Rheb سنتز پروتئین و رشد سلولی را مهار می‌کند (Aspuria and Tamanoi, 2004). بیان بیش از حد Rheb-GAP فعالیت mTOR را مهار می‌کند و ناحیه برش عرضی فیبر را در ماهیچه‌های اسکلتی پستانداران کاهش می‌دهد (Wan et al., 2006). اگرچه ژن Rheb در موش، بز و انسان شناسایی شده است، اما عملکردهای فیزیولوژیک آن به طور کامل مطالعه نشده است و نیاز است که شفاف سازی در این زمینه صورت گیرد. با همه این وجود این ژن در ایران روی هیچ یک از دام-های کشور مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا هدف این مطالعه بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی و مقایسه سطوح مختلف بیان آن برای اولین بار بود.

مواد و روش ها

برای تهیه‌ی نمونه های بافتی شامل مغز، قلب، شش، پانکراس، طحال، کلیه، کبد و بیضه

Archive of SID

www.SID.ir

(از هر بافت ۳ تکرار) مربوط به بز کرکی رائینی اقدام به خریداری یک بز نر ۱۷ ماهه کرکی رائینی از گله ای واقع در شهرستان جیرفت شد. بزهای موجود در این گله فقط از نژاد کرکی رائینی بودند که از مرکز اصلاح نژاد بز کرکی رائینی واقع در شهرستان بافت خریداری شده بودند. بلافاصله پس از کشتار قطعات کوچکی از اندام های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر چند عدد از میکروتیوب ها در داخل یک فویل آلومینیومی قرار داده شد و سریعاً به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از انجماد سریع نمونه ها در داخل فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

پایداری RNA از DNA کمتر است و نسبت به تخریب در هنگام جمع آوری، فرآیندکردن و نگهداری نمونه بسیار حساس‌تر است. توالی‌های بلند RNA به سادگی تخریب می‌شوند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase[1] انجام شود. قبل از انجام استخراج RNAتمامی وسایل توسط آب DEPC[2] (سیناژن، MR8244) از RNase عاری[3] شدند. برای استخراج RNA از نمونه های بافتی فوق (از هر بافت ۳ تکرار) از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا (S-1020) استفاده گردید. RNA استخراج شده در دمای منفی۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری و کیفیت و کمیت RNA با روش های اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد (RerertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این امر از مقدار ۱۰ ng–۵µg از RNA کل یا ۱ ng–۵۰۰ng از Poly (A) mRNA استفاده می شود. ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید، لذا جهت یکسان کردن RNA به کار رفته برای ساخت cDNA، مقدار ۱ میکروگرم از RNA به کار رفت. برای انجام واکنش های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس می-تواند مستقیما برای PCR استفاده شود و یا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای کمتر از یک هفته نگهداری شود. برای نگهداری در زمانی طولانی تر، ذخیره در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد توصیه می‌شود.

واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از PCR Master Kit (PR8251C) شرکت سینا ژن صورت گرفت. توالی پرایمر پیشرو و برگشتی Rheb به ترتیب 5'-ATG CCG CAG TCC AAG TCC-3' و 5'-TCA CAT CAC CGA GCA GGA AG-3' (شرکت ژن فن آوران) (Zheng *et al.*, 2011) و توالی پرایمر پیشرو و برگشتی بتااکتین به ترتیب 5'-TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAC GAG-3' و 5'-CGT CCC CAG AGT CCA TGA CAA TG-3'

[1]RNase-free environment
[2]Di Etyhyl Pyro Carbonate water
[3]RNase-free

Archive of SID

www.SID.ir

(شرکت سیناژن) بود (Zheng *et al.*, 2011). مقادیر مختلف اجزای واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix با غلظت ۱x، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت با غلظت µM ۱-۰/۱، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت µM ۱-۰/۱، ۲ میکرولیتر cDNA با غلظت ۱µg- ۱۰pg و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. شرایط انجام واکنش PCR به صورت واسرشت کردن اولیه در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤ دقیقه، انجام ۳۵ سیکل با شرایط واسرشت کردن در ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ٦۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤۰ ثانیه و سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از پایان آزمایشات مولکولی، با استفاده از تصویر گرفته شده توسط دستگاه تصویربرداری از ژل و نرم افزار Gene Tools(۳.۰۷.۰۲) سطوح مختلف بیان در بافت های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نرم افزار SPSS معنی داری نتایج مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف معنی دار بین گروه‌ها از آزمون دانکن و درجه معنی داری $P\leq ۰/۰۱$ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی اعداد جذب نمونه های استخراج شده در دستگاه اسپکتروفتومتری بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب نمونه های RNA در نسبت طول موج A_{260}/A_{280} بود (شکل ۱). همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است دو باند S ۱۸ و S ۲۸ به وضوح ملاحظه می شود.

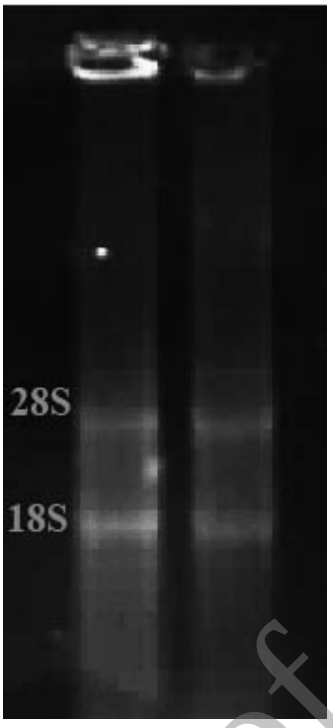
مشاهده تک باند در محدوده ۵۵۵ bp برای پرایمر Rheb و در محدوده ۲۲۹bp برای بتاکتین در مورد تمامی نمونه ها، بیانگر صحت انجام PCR و مراحل قبلی آزمایش می باشد (شکل ۳). نتایج حاصل نشان داد که این ژن در تمام بافت های مورد بررسی بیان می‌شود. در بررسی دقیق بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی رائینی با استفاده از نرم افزار Gene Tools دیده شد که این ژن به مقدار زیادی[1] در بافت کلیه بیان شده است و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شده است (شکل ٤).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان می دهد که بیان ژن Rheb در بز کرکی رائینی در بین بافت های مختلف تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد دارد (جدول ۱).

[1] over expression

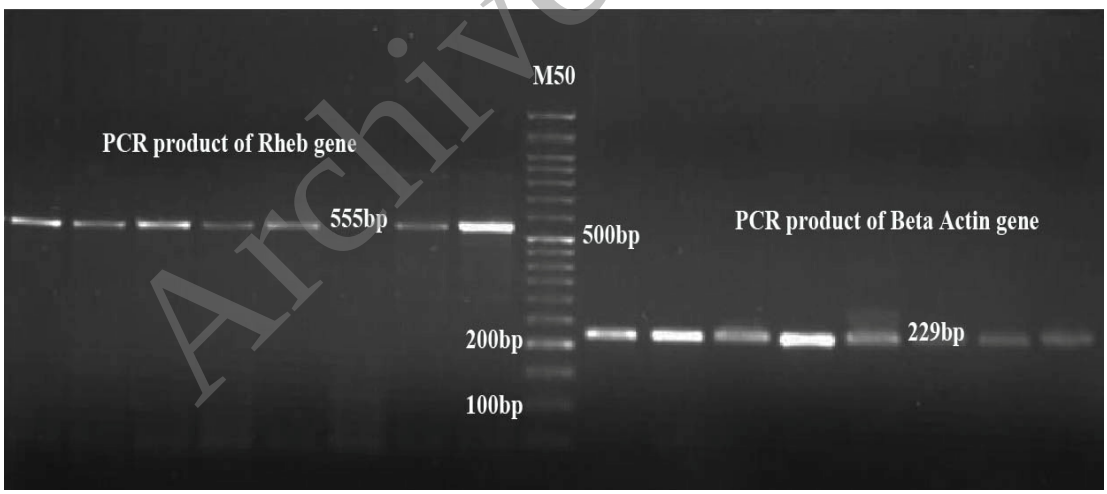
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- نمونه هایی از RNA های استخراج شده.

Figure 2- Samples of the extracted RNA.

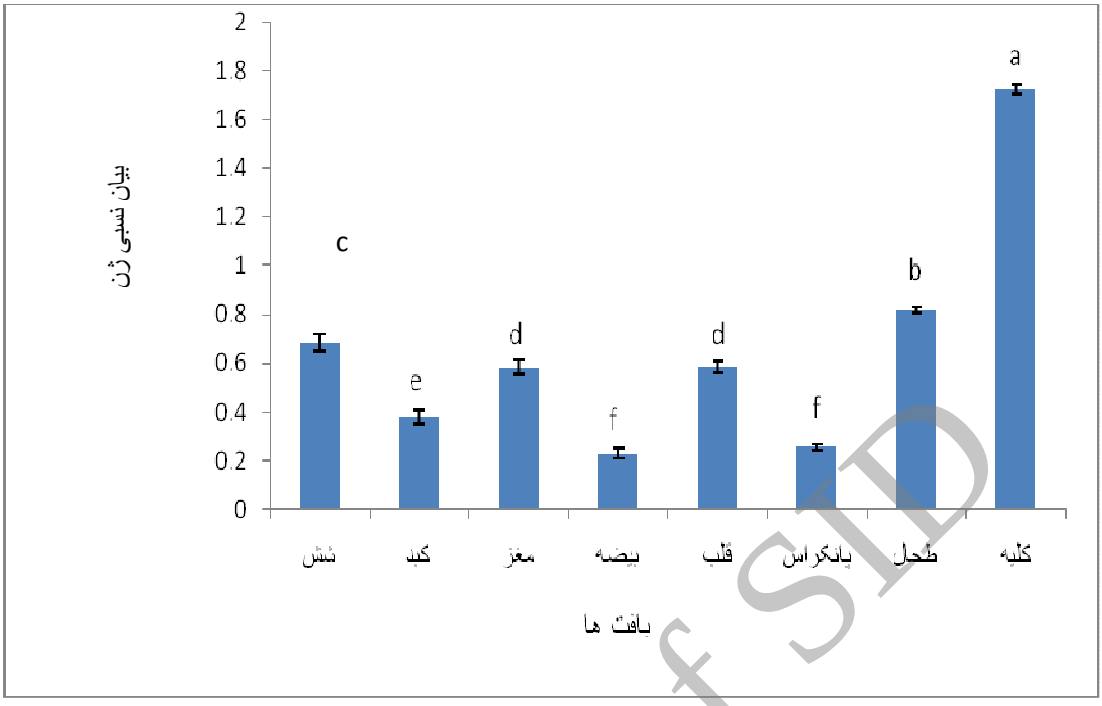


شکل ۳- الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای Rheb و بتااکتین (کنترل). M50؛ نشانگر اندازه.

Figure 3- Electrophoresis of studied samples using Rheb and beta Actin (control) primers. M50; size marker.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- سطوح مختلف بیان نسبی ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی رائینی (از ۰ تا ۲۰۰ درصد).

Figure 4- different levels of Rheb gene relative expression in different tissues of Raini Cashmir goat (from 0 to 200%).

جدول ۱- تجزیه واریانس بیان ژن Rheb در بز کرکی رائینی در بین بافت های مختلف.

Table 1- ANOVA of Rheb gene expression in Raini Cashmir goat between different tissues.

	مجموع مربعات Sum of Squares	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	F	معنی داری Sig.
بین گروه ها Between Groups	4.782	7	0.683	1171.117	0.000
داخل گروه ها Within Groups	0.009	16	0.001		
کل Total	4.791	23			

Archive of SID

www.SID.ir

در این پژوهش بیان ژن Rheb در هشت اندام مختلف بز کرکی رائینی با استفاده از روش RT PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت کلیه و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شد. در بررسی مشابهی که توسط Zheng *et al.* (2011) بر روی بز کرکی مغولی انجام شده بود بیشترین سطح بیان در مغز دیده شده بود و بیان آن در قلب و طحال محدود شده بود، که این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت دارد که شاید دلیل آن تفاوت در ژنوتیپ، تأثیر محیط بر روی ژنوتیپ، سن، جنس و نوع تغذیه باشد که باید در پژوهش‌های بعدی مد نظر قرار گیرد. در پژوهش صورت گرفته روی این ژن توسط Yamagata *et al.* (1994) در موش دیده شد که ژن Rheb در سطوح بالایی در هیپوکامپوس و کورتکس مغزی بیان شده است و در بافت های شش، تیموس، کلیه و روده هم به میزان زیادی بیان شده است. در بررسی های صورت گرفته توسط Tabancay *et al.* (2003) بر روی ژن Rheb در انسان نشان داده است که سطح بالایی از آن در قلب و ماهیچه های اسکلتی بیان شده است. اما، در بررسی Eom *et al.* (2008) ژن Rheb در انسان به میزان زیادی در خیلی از بافت های بدن از جمله شش، کلیه، پوست و روده بیان شده است. در بررسی دیگری هم که توسط Gromov *et al.* (1995) بر روی بافت های مختلف انسان انجام شده بود، مشاهده شده که این ژن در بافت های مختلف انسان بیان شده و بیشترین سطح بیان در ماهیچه های قلبی و اسکلتی (و نه در مغز) دیده شد و کمترین سطح بیان در شش و کبد مشاهده شد. اما در بررسی دیگری روی انسان توسط Saito *et al.* (2005) بیشترین سطح بیان در مغز و کمترین سطح بیان در طحال مشاهده شد. در تحقیق حاضر، از لحاظ بیان ژن Rheb، بین نمونه های قلب با مغز و بین نمونه های پانکراس با بیضه تفاوت معنی داری وجود نداشت، اما بین سایر گروهها تفاوت معنی دار وجود داشت ($P<0.01$). لذا، می‌توان نتیجه گرفت که ژن Rheb نقش مهمی را در سلول های بز ایفا می‌کند.

منابع

Ahmadikhah A (2008). Advancsd Genetics. Publication of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan (In Farsi).

Aspuria PJ, Tamanoi F (2004). The Rheb family of GTP-binding proteins. Cell Singnal 16: 1105-1112.

Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang Q J, Liu Y, Jiang Y (2007). Rheb activaties mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor FKBP38. Science Magazine 318: 977-980.

Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature 349: 117-127.

Archive of SID

www.SID.ir

Buerger C, DeVries B, Stambolic V (2006). Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. Biochemical and Biophysical Research Communications 344: 869–880.

Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. The Journal of Biological Chemistry 278: 32493-32496.

Clark GJ, Kinch MS, Rogers-Graham K, Sebti SM, Hamilton AD and Der CJ (1997). The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. Journal of Biological Chemistry 272: 10608–10615.

Eom M, Han A, Yi SY, Shin JJ, Cui Y, Park KH (2008). RHEB expression in fibroadenomas of the breast. Pathology International 58: 226–232.

Gromov PS, Madsen P, Tomerup N, Celis JE (1995). A novel approach for expression cloning of small GTPases: identification, tissue distribution and chromosome mapping of the homolog of rheb. FEBS Letters 377: 221– 226.

Hancock JF, Magee AI, Marshall CJ (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. Cell 57: 1167-1177.

Hay H, Sonenberg N (2004). Upstream and downstream of mTOR. Gene and Development 18: 1926-1945.

Im E, von Lintig FC, Chen J, Zhuang S, Qui W, Chowdhury S, Worley PF, Boss GR and Pilz RB (2002). Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. Oncogene 21: 6356–6365.

Jiang H and Vogt PK (2008). Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. Oncogene 27: 5729–5740.

Katharina U, Matthias W, Reinhard W, Gunter F, Alfred W, Lgnacio R (2009). Reassessment of the role of FKBP38 in the Rheb/Mtorc1 pathway. FEBS Letters 583: 965-970.

Kinsella BT, Erdman RA, Maltese WA (1991). Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnysyl venrsus geranylgenranyl isoprenoids is determined by the COOH-terminal amino acid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88: 8934-8938.

Knox JP (1995). The extracellular matrix in higher plants. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. The FASEB Journal 9: 1004-1012.

Lau LF, Nathans D (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 84: 1182-1186.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Busch S, Avruch J (2007). The Rheb Switch 2 Segment Is Critical for Signaling to Target of Rapamycin Complex. The Journal of Biological Chemistry 282: 18542–18551.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005). Rheb binds and regulates mTOR kinase. Current Biology 15: 702-713.

Ma D, Bai X, Guo S, Jiang Y (2008). The switch I region of Rheb is critical for its interaction with FKBP38. The Journal of Biological Chemistry 283: 25963-25970.

Rosel D, Khurana T, Majithia A, Huang X, Bhandari R and Kimmel AR (2012). TOR complex 2 (TORC2) in Dictyostelium suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1mediated nutrient sensing. Journal of Cell Science 125: 37–48.

Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85: 7795- 7799.

Archive of SID

www.SID.ir

Saito K, Araki Y, Kontani K, Nishina H, Katada T (2005). Novel Role of the Small GTPase Rheb: It's Implication in Endocytic Pathway Independent of the Activation of Mammalian Target of Rapamycin. Journal of Biochemistry 137: 423–430.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005). Growing role for the mTOR pathway. Current Opinion in Cell Biology 17: 596-607.

Sato T, Umetsu A, Tamanoi F (2008). Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalia cells: constitietive active mutants of Rheb and mTOR. Methods Enzymol 438: 307-320.

Tabancay AP, Gau CL, Machado IMP, Uhlmann EJ, Gutmann DH, Guo L, Tamanoi F (2003). Identification of Dominant Negative Mutants of Rheb GTPase and Their Use to Implicate the Involvement of Human Rheb in the Activation of p70S6K. The Journal of Biological Chemistry 278: 39921–39930.

Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPaseactivating protein complex toward Rheb. Current Biology 13: 1259-1268.

Urano J, Ellis C, Clark GJ and Tamanoi F (2001). Characterization of Rheb functions using yeast and mammalian systems. Methods in Enzymology 333: 217–231.

Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, Worley PF (1994). Rheb, a growth factor-and synaptic-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. The Journal of Biological Chemistry 269: 16333-16339.

Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. Nature Cell Biology 5: 578-581.

Zheng Xu, Yang JF, Wang XJ, Liang Y, Wu ML, Shi JJ, Zhang T, Qin Y, Li SY, Hao XY, Wang ZG, Liu DJ (2011). Molecular Characterization and Expression Pattern of Rheb Gene in Inner Mongolia Cashmere Goat (Capra hircus). Agricultural Sciences in China 10: 1452-1458.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat

Tohidi nezhad F.[1], Mohammadabadi M.R.[*2], Esmailizadeh A.K.[2], Najmi Noori A.[3]

[1] MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
[3] MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University.

Abstract

Rheb (Ras homolog enriched in brain) gene is originally identified as immediate early gene (IEG) in 1994, encoding 184 amino acids with a deduced molecular mass of 20 497 Da in hippocampus. Rheb belongs to Ras family that encodes a carboxylterminal CAAX box indicating that the protein may undergo post-translational farnesylation. Rheb is an upstream regulatory factor in mTOR signaling pathway and the Rheb-GTP can active mTOR that inducing strong phosphorylation of endogenous S6K1 at residues Thr389, Thr421 and Ser424. Overexpression of Rheb stimulates cell growth while knockdown of Rheb expression inhibits protein synthesis and cell growth in insects. Over expression of Rheb-GAP inhibits mTOR activation and reduces fiber cross-sectional area in mammalian skeletal muscle. There is cross-talk between Mstn and mTOR signaling pathways in mammalian skeletal muscles. Tissues including brain, heart, lung, pancreatic, spleen, kidney, liver and testis were collected from the Raini Cashmir goat after slaughter. Extracted RNA were immediately stored at -80°C. Quality and quantity of RNA were evaluated and cDNA was synthesized and PCR was performed. PCR Products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and were evaluated different levels of expression in studied different tissues. Results showed that the Rheb gene was expressed in all the tested tissues and the highest level of expression was observed in kidney and the lowest level was detected in pancreatic and testis. Results of SPSS analyziz demonstrated that expression of Rheb gene in Raini cashmir goat significantly ($P \leq 0.01$) is different in various tissues. Hence, can suggest that Rheb has probably role in goat cells and must detect in future investigations.

Keywords: *Rheb gene, Raini Cashmir Goat, Expression, tissue.*

[*] Corresponding Author: Mohammadabadi M.R. Tel: 09133987534 Email: mmohammadabadi@yahoo.ca

Archive of SID

www.SID.ir