

## جهت گیری سیتوزولی پراکسیزومال پروتئین موشی فاقد تری پپتید SKI متصل به پروتئین سبز فلورسنت در سلول‌های CHO-K1 و P19

مریم استادشیریف <sup>۱</sup>M.Sc، کامران قائدی <sup>۲،۳</sup>Ph.D، محمد حسین نصرافسانی <sup>۴</sup>Ph.D، سمیه تنهایی <sup>۵</sup>M.Sc،  
خدیجه کربلایی <sup>۱</sup>M.Sc، کاظم پریور <sup>۱</sup>Ph.D، حسین بهاروند <sup>۲،۴</sup>Ph.D

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، اصفهان، ایران
۳. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
۴. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست تکوینی، تهران، ایران
۵. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

\* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، اصفهان، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

پست الکترونیک: Emails:kamranhaedi@royaninstitute.org

mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۵/۱۳، پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۸

### چکیده

\* **هدف:** آنالیز اسید آمینه‌ای ژن پراکسیزومال پروتئین نشان می‌دهد که در انتهای کربوکسیل در این سازه قلمرو SKI وجود دارد. به منظور یافتن اهمیت این بخش، از طریق ایجاد موتاسیون هدف‌دار تری پپتید SKI حذف گردید و در سلول‌های CHO-K1 و P19 ترانس فکت گردید.

\* **مواد و روش‌ها:** به منظور ایجاد سازه جهش یافته مورد نظر PCR با استفاده از پرایمرهای مناسب صورت گرفت. موتانت حاصل در فرودست ژن EGFP تحت کنترل پروموتور CMV قرارداد. پس از تعیین توالی با کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به درون سلول‌های CHO-K1 و P19 ترانس فکت گردید.

\* **یافته‌ها:** گزادیان دمایی PCR نشان می‌دهد که بهترین دمای اتصال، ۷۱/۶ درجه است. ترانس فکت نمودن EGFP-PeP الگوی سبز رنگ نقطه دار دارد، در حالی که سازه EGFP-PeP/ΔSKI پس از ترانس فکت نمودن الگوی یکنواخت سبز رنگ دارد.

\* **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌شود که SKI در انتهای کربوکسیل پروتئین برای ورود به پراکسیزوم لازم و ضروری است.

\* **کلیدواژگان:** پپتیدناشنه، پراکسیزومال پروتئین، سیگنال هدف یابی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۵۹-۱۵۴

### مقدمه

پراکسیزوم‌ها اولین بار در سال ۱۹۵۴ کشف شدند و میکروبادی نام گرفتند، اما در سال ۱۹۶۵ فعالیت پراکسیداسیونی میکروبادی‌ها شناسایی شد و ساختار فوق پراکسیزوم نام گرفت (۱، ۲).

پراکسیزوم‌ها از جمله ارگانل‌های سلول‌های یوکاریوتیک می‌باشند که طیف وسیعی از عملکردها را بر عهده دارند (۳، ۴). فعالیت‌های متابولیک پراکسیزوم شامل  $\beta$ -اکسیداسیون اسیدهای چرب با زنجیره بسیار طویل، تجزیه پراکسید هیدروژن، سنتز پلاسمالوژن‌ها، ایزوپرنوئیدها، متابولیسم پورین‌ها و پیریمیدین‌ها، کاتابولیسم پلی آمین‌ها، D-آمینواسیدها و متانول می‌باشد. اهمیت نقش عملکردی پراکسیزوم‌ها در بیماری‌های ژنتیکی از قبیل سندرم زلوگر مشخص می‌شود (۵، ۶).

بیورژن پراکسیزوم یک فرایند پیچیده چند مرحله‌ای است که توسط گروهی از پروتئین‌ها تحت عنوان پراکسین (Pexp) هدایت می‌شود (ژن پروتئین پراکسین PEX نامیده می‌شود) (۷). تاکنون حدود ۳۲ ژن PEX شناسایی شده است (۸). از آنجایی که پراکسیزوم فاقد هرگونه ماده ژنتیکی است، پروتئین‌های آن توسط ژن‌های هسته‌ای کد

شده و بر روی پلی‌ریبوزوم‌های آزاد ترجمه می‌گردد؛ سپس به درون پراکسیزوم‌هایی که از قبل در سیتوزول وجود داشته‌اند منتقل می‌گردند (۹). عمده پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی برای ورود نیازمند Peroxisomal Targeting Signal (PTS) می‌باشند (۱۰).

PTS1 در انتهای کربوکسیل و PTS2 در انتهای آمینی قرار دارد. این سیگنال‌ها توسط گیرنده‌های خاص سیتوزولی شناسایی می‌شوند: Pex5p برای پروتئین‌های PTS1 و Pex7p برای پروتئین‌های PTS2 به عنوان گیرنده عمل می‌کند (۱۱). PTS1 یک موتیف سه اسید آمینه‌ای با ترادف توافق شده SKL (سرین - لیزین - لوسین) می‌باشد (۱۲)، در حالی که PTS2 یک ترادف نه اسید آمینه‌ای در انتهای آمینی یا در بخش میانی پروتئین است. ترادف PTS2 به صورت زیر است: L/A, Q/H, X5, L/V/I, R/K (۱۳).

در مورد انتقال پروتئین‌های غشا در پراکسیزوم اطلاعات اندکی وجود دارد. این پروتئین‌ها واجد سیگنالی به نام mPTS (Membrane Peroxisomal Targeting Signal) هستند. دارای مجموعه‌ای از اسیدهای آمینه با بار مثبت می‌باشد که شباهت زیادی به ترادف‌های عرض گذر (Transmembrane) دارد (۱۴).

### ساخت پلاسمید بیانی حامل EGFP-PeP/ $\Delta$ SKI

محصول PCR پس از تخلیص از ژل توسط کیت Gel Extraction (QIAGEN) مورد هضم توسط آنزیم‌های *Bgl*/II (Fermentas) و *Sa*II (TaKaRa) قرار گرفت. همچنین وکتور EGFP-C1 نیز توسط دو آنزیم محدودالثر فوق‌الذکر برش یافت؛ آنگاه الحاق قطعه PeP/ $\Delta$ SKI به درون پلاسمید EGFP-C1 توسط TaKaRa ligation kit صورت پذیرفت. پلاسمید نو ترکیب حاصل به درون باکتری‌های *TOP10* competent (Invitrogen) به روش شوک حرارتی وارد شدند. از بین کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت 2YT حاوی کانامایسین ۳۰ میکروگرم در هر میلی لیتر چند کلونی جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب گردیده و پس از اطمینان از وجود پلاسمید نو ترکیب در داخل آنها جهت تعیین توالی به کمپانی Bioneer (کره جنوبی) ارسال گردیدند.

### تعیین توالی DNA

برای تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب وارد شده به کلونی‌های باکتریایی از دو پرایمر EGFP-C1 (۱۶) و R EGFP-C1 (۱۶) استفاده گردید.

### طراحی پرایمر

طراحی پرایمر با توجه به توالی‌های PEP cDNA (NM-027402) GenBank، پلاسمید EGFP-C1 (Clontech, catalog #6084-1) و با استفاده از نرم‌افزار Oligo 6.2<sup>®</sup> انجام شد. پرایمرهای سنتز شده از شرکت Bioneer با واسطه شرکت تکاپوزیست خریداری شد.

### کشت سلولی و ترانس فکت نمودن آنها

رده سلولی CHO از پژوهشکده رویان تهران تهیه گردید. سلول‌های CHO در محیط کشت Ham'sF12 (Sigma) حاوی FCS (Gibco) در انکوباتور با ۵ درصد  $CO_2$  و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. پس از مفروش شدن کف فلاسک، سلول‌ها به کمک تریپسین حاوی EDTA (Gibco) از کف دیش جدا شده و پس از شمارش سلولی، تعداد ۱۵۰۰۰ سلول در هر خانه دیش‌های ۲۴ خانه که از قبل لامل‌گذاری (لامل ۲۴×۲۴ میلی‌متر) شده بودند، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۶۰-۵۰ درصد کف دیش را پر کردند، سپس بر اساس دستورالعمل Lipofectamine 2000 (Inv) -itrogen پلاسمید مورد نظر به درون سلول‌ها ترانس فکت گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانس فکت نمودن، به منظور بررسی بیان ژن در سلول‌های ترانس فکت شده، این سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد (Sig) تثبیت و جهت ردیابی مارکر پراکسیزومی کاتالاز در سلول‌های مذکور، ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی اولیه ۳۰۰:۱ (abcam Rabbit) (Anti Catalase) و آنتی بادی ثانویه ۴۰۰:۱ (Amersham Texas) (Red) انجام شد. نتایج با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympus BX5 مشاهده شد.

برای کشت سلول‌های P19 همه مراحل مانند سلول‌های CHO بود اما ترکیب محیط کشت این سلول‌ها به صورت زیر بود: DMEM (Gibco) حاوی ۱۰ درصد ES-FCS سلول‌ها در انکوباتور با ۵ درصد  $CO_2$  و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

یکی از پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی که در سال ۲۰۰۲ توسط فرر مارتینز و همکارانش کلون گردید، پروتئین پراکسیزومی به نام Peroxisomal Protein (PeP) می‌باشد. از جمله خصوصیات این پروتئین، افزایش بیان در طی میوزن و تمایز مغز جنین موش است (۱۴). آنالیز اسید آمینه‌ای نشان از وجود چندین قلمرو در این پروتئین است: دو ناحیه هیدروفوبیک که یکی بین اسید آمینه ۱۲ (آلانین) تا اسید آمینه ۳۱ (پرولین) و دیگری بین اسید آمینه ۱۵۲ (والین) تا ۱۶۹ (فیل آلانین) وجود دارد. قلمرو فیبرونکتین تیپ III (Fibronectin Type III Domain) از اسید آمینه ۱۱۴-۳۱ و تری‌پپتید SKI است که به عنوان سیگنال پپتید در انتهای کربوکسیل پروتئین قرار داشته و شباهت به SKL دارد (۱۴). هدف از این مطالعه، بررسی اهمیت قلمرو تری‌پپتید SKI در انتقال این پروتئین به داخل پراکسیزوم می‌باشد به طوری که با حذف SKI و ساخت سازه موتاسیونی مورد نظر، جهت گیری داخل سلولی آن با ترانس فکت به درون سلول‌های P19 و CHO-K1 این سنجش انجام پذیرفت.

### مواد و روش‌ها

این پروژه در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان بررسی و عدم تعارض آن با مطالعات دیگر به تایید رسیده است.

### ساخت موتانت $\Delta$ SKI

برای ساخت سازه مورد نظر از روش ایجاد موتاسیون هدف‌دار استفاده شد (۱۵). در این مطالعه از یک جفت پرایمر برای PCR یک مرحله‌ای مورد استفاده قرار گرفت. DNA الگو مورد استفاده PEP cDNA می‌باشد که در آزمایشگاه مولکولی پژوهشکده رویان، پایگاه تحقیقاتی اصفهان کلون گردید (۱۶). به منظور به دست آوردن دمای بهینه اتصال در انجام PCR از شرایط شیب دمایی (Gradient) مرحله اتصال از محدوده دمای ۷۱/۶ درجه سانتی‌گراد و ۵۹/۶ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید.

دستورالعمل PCR مورد استفاده جهت تکثیر قطعه PEP cDNA/ $\Delta$ SKI بر پایه دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient به شرح زیر انجام گرفت: دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه (به استثنای مرحله اول که ۳ دقیقه می‌باشد)، دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی‌گراد با زمان ۶۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱۲۰ ثانیه در طی ۳۵ دور بود. در پایان، واکنش پس از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت.

مواد مورد نیاز جهت PCR شامل PEP cDNA به عنوان الگو با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، 10X PCR Buffer به میزان ۲/۵ میکرولیتر، ۵ پیکومولار از هر پرایمر:

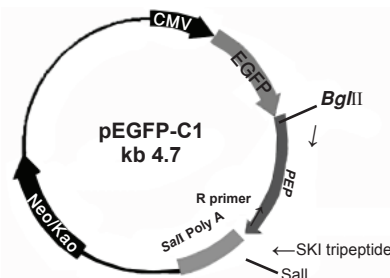
Forward: 5'ATTAGATCTCCCCAGGGCCGTGCGCC 3'  
با دمای ۷/۷۴ درجه سانتی‌گراد: Tm و جایگاه *Bgl*/II در انتهای 5' پرایمر؛ پرایمر Reverse:

5'ATAGTCCGACTCAGCGGAGGAGACCCACC 3'  
با دمای ۷۲/۸ درجه سانتی‌گراد: Tm و جایگاه *Sa*II در انتهای 5' پرایمر، dNTP به میزان ۱۰ نانو مولار، Pfu DNA polymerase به اندازه ۲/۵ واحد، مابقی واکنش تا به حجم ۲۵ میکرولیتر اضافه گردید. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

## یافته‌ها

## تکثیر ژن هدف

با توجه به شکل PEP cDNA که در پایین دست ژن EGFP قرار دارد، برای طراحی پرایمر، ابتدا و انتهای ژن مد نظر قرار گرفته شد.



شکل ۱: شکل شماتیک مربوط به پلاسمید EGFP-C1 که تحت کنترل پروموتور CMV است. در بین جایگاه آنزیمی BglII و cDNA SalI مربوط به PEP قرار گرفته است. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به کانامایسین و نئومایسین است.

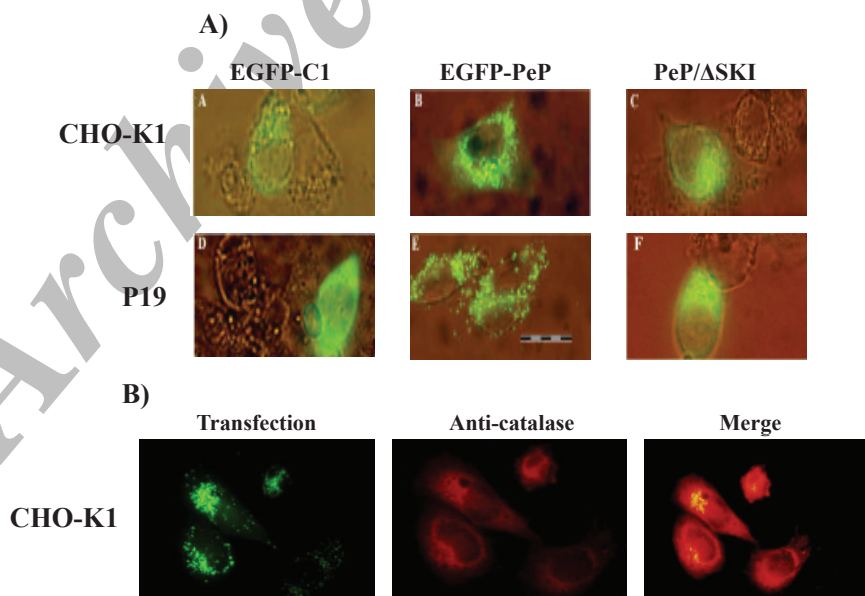
برای طراحی پرایمر Reverse حذف تری پپتید SKI لحاظ گردید. بر اساس PCR انجام شده بر پایه شیب دمایی از دمای اتصال ۵۹/۶-۷۱/۶ درجه سانتی گراد بهترین دمای اتصال جهت انجام PCR ۷۱/۶ درجه سانتی گراد برآورد شد. اما پس از انتخاب دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی گراد، تکثیرقطعه مورد نظر صورت پذیرفت. طول محصول ایجاد شده ۶۴۰ جفت باز بوده که پس از تخلیص

از ژل محصول مورد نظر و پلاسمید EGFP-C1 به طور جداگانه توسط آنزیم‌های محدود کننده BglII و SalI مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پس از ترانس فورماسیون باکتری از میان حدود ۷۰-۶۰ کلونی ایجاد شده، ۲۰ کلونی جهت تأیید وجود پلاسمید نو ترکیب مورد آزمایش PCR قرار گرفت. از میان دو کلونی باکتریایی حاوی پلاسمید نو ترکیب جهت استخراج پلاسمید انتخاب و پلاسمیدهای نو ترکیب برای تعیین توالی ارسال گردیدند که صحت ساخت سازه‌های پلاسمیدی تأیید گردد.

ترانس فکت نمودن برای پلاسمیدهای EGFP-C1/EGFP-PEP و EGFP C1/EGFP-PEPΔSKI به درون سلول‌های CHO-K1 و P19

نتایج حاصل از ترانس فکت نمودن EGFP-C1 به درون سلول‌های CHO-K1 و P19 نشان دهنده الگوی سبز رنگ سیتوپلاسمی یکنواختی در سلول‌های ترانس فکت شده بود (شکل ۲a: A، D) به دنبال ترانس فکت نمودن سلول‌های P19 و CHO توسط پلاسمید EGFP-PeP الگوی سبز رنگ نقطه‌دار مربوط به انتقال پروتئین به داخل اندامک‌های پراکسیزوم مشاهده گردید (شکل ۲b: B، E). انتقال این پروتئین به داخل اندامک پراکسیزوم از طریق رنگ آمیزی اختصاصی در سلول‌های CHO-K1 با استفاده از آنتی بادی آنتی-کاتالاز تأیید گردید (شکل ۲b). هنگامی که سازه پلاسمیدی EGFP C1/EGFP-PEPΔSKI به درون سلول‌های P19 و CHO ترانس فکت گردید، الگوی سیتوپلاسمی مشابه EGFP-C1 دیده شد.

زیرا هیبرید حاصل در بخش کربوکسیل دارای ساختمان PeP فاقد تری پپتید انتهایی SKI می‌باشد (شکل ۲a: C، F).



شکل ۲: ترانس فکت نمودن موقتی EGFP C1/EGFP-PEP و EGFP C1/EGFP-PEPΔSKI در سلول‌های CHO-K1 و P19.

a: الگوی سبز رنگ یکنواخت ناشی از ترانس فکت نمودن EGFP-C1 در سلول‌های CHO (A) و سلول‌های P19 (D) می‌باشد. پروتئین هیبرید EGFP و PeP به دلیل داشتن تری پپتید SKI الگوی نقطه‌ای سبز رنگ در سلول‌های CHO (B) و سلول‌های P19 (E) از خود نشان می‌دهد. این نقاط سبز بیانگر وجود پراکسیزوم است. سازه PEP/ΔSKI به دلیل حذف تری پپتید SKI از انتها الگوی سیتوپلاسمی یکنواخت نشان می‌دهد (C، F).

b: رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های CHO-K1 ترانس فکت شده توسط آنتی کاتالاز. EGFP-PeP ترانس فکت شده به صورت دانه‌های سبز رنگ دیده می‌شود در حالی که در همان زمینه پس از رنگ آمیزی با آنتی کاتالاز دانه‌های قرمز رنگ دیده می‌شود. پس از merge نمودن، دانه‌های زرد رنگ در سلول‌های CHO-K1 دیده می‌شود. تمام تصاویر با کمک میکروسکوپ فلورسنت گرفته شده است. مقیاس معادل ۲۰ میکرومتر است.

## بحث

قرار گرفت. ایجاد پروتئین هیبرید بین پروتئین مورد مطالعه و پروتئین نشان‌دار یکی از راه‌های مناسب جهت ردیابی درون سلولی پروتئین مورد مطالعه است. از نمونه پروتئین‌های نشان‌دار می‌توان به EGFP اشاره کرد. EGFP پس از ورود به درون سلول پس از تابش نور UV به رنگ سبز دیده می‌شود. ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که اتصال نامناسب EGFP می‌تواند با پوشاندن سیگنال هدف‌یابی موجب انتقال نابه‌جای پروتئین‌های درون سلولی شود (۲۱). از آن جا که پروتئین هیبرید EGFP-PeP در پایانه کربوکسیل خود حاوی تری‌پپتید SKI است در اندامک پراکسیزوم جای‌گیری می‌شود (۱۴، ۱۶) می‌توان نتیجه گرفت که اضافه نمودن EGFP به پایانه آمینی پروتئین PeP تاثیری بر هدف‌یابی داخل پروکسیزومی این پروتئین ندارد. بنابراین به منظور بررسی اهمیت وجود تری‌پپتید SKI پروتئین EGFP cDNA در بالادست سازه PeP cDNA/ΔSKI ساخته شد تا هدف‌یابی درون سلولی پروتئین آن مورد بررسی قرار گیرد. پس از ترانس‌فکت نمودن موقتی سازه فوق در سلول‌های P19 و CHO در سیتوپلاسم سلول‌های ترانس‌فکت شده، رنگ یکنواخت سبز مشاهده گردید که حالتی مشابه با ترانس‌فکشن موقتی سازه EGFP داشته است.

## نتیجه‌گیری

به این ترتیب آشکار گردید که وجود تری‌پپتید SKI در ورود پراکسیزومال پروتئین موشی لازم و ضروری است.

## تقدیر و تشکر

بخش عمده هزینه‌های انجام این پروژه از طرح مصوب پژوهش‌کده رویان به شماره ۲-۱۴۸ و بخشی از هزینه‌های انجام این پروژه نیز از طرح مصوب دانشگاه اصفهان با عنوان "کلونینگ و ارزیابی عملکرد ساختار cDNA ژن پروتئین پراکسیزومی موش" به شماره ۱۷/۸۵۱۰۱۷ به تاریخ ۱۷/۱۰/۸۵ تأمین گردید.

## References

1. Suzuki Y, Shimozawa N, Imamura A, Fukuda S, Zhang Z, Orii T, et al. Clinical, biochemical and genetic aspects and neuronal migration in peroxisome biogenesis disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2001; 24: 151-165.
2. Singh I, Carillo O, Namboodiri A. Isolation and biochemical characterization of peroxisomes from cultured Rat glial cells. *Neurochem Res*. 2000; 25(2): 197-203.
3. Wanders RJA, Waterham HR. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem*. 2006; 75: 295-332.
4. Hayashi M, Nishimura M. Entering a new era of research on plant peroxisomes. *Curr Opin Plant Biol*. 2003; 6: 577-582.
5. Furuki S, Tamura S, Matsumoto N, Miyata N, Moser A, Moser HW, et al. Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group 8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with Pex1p-Pex6p complex. *J Biol Chem*. 2006; 281(3): 1317-1323.
6. Sheikh FG, Pahan K, Khan M, Barbosa E, Singh I. Abnormality in catalase import into peroxisomes leads to severe neurological disorder. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 2961-2966.

در میان سلول‌های پستانداران، سلول‌های P19 از جمله سلول‌های ترانوکارسینوما می‌باشد که در حضور رتینوئیک اسید به نوروئیک تمایز می‌یابند. این سلول‌ها به راحتی ترانس‌فکت شده و پس از گرفتن رده سلولی پایدار، می‌توان به مطالعه بیان ژن مورد نظر در زمان تمایز نورونی پرداخت. هم‌چنین به عنوان یک مدل سلولی مناسب جهت بررسی پروتئین‌های نورونی اولیه و بالغ در نظر گرفته می‌شوند (۱۷). سلول‌های CHO نیز به دلیل رشد آسان و سریع و ژنوتیپ هیپودپلوئیدی که دارند به عنوان سلول‌های مدل کاربرد وسیعی دارند (۱۸). بنابراین در این مطالعه با کمک تکنیک ایجاد موتاسیون هدفدار اثر حذف تری‌پپتید SKI از انتهای پراکسیزومال پروتئین موشی در دوره سلولی ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد موتاسیون هدف‌دار یکی از تکنیک‌های مهم در مطالعه بیان ژن و اهمیت قلمروهای مختلف در ساختمان پروتئین است.

یکی از پروتئین‌های تازه شناخته شده پراکسیزومی، پراکسیزومال پروتئین می‌باشد که تنها یک گزارش در مورد کلونینگ cDNA آن در موش وجود دارد (۱۴).

ساختار اصلی پراکسیزومال پروتئین موشی حاوی ۲۰۹ اسیدآمینه می‌باشد که انتهای کربوکسیل آن دارای تری‌پپتید SKI بوده و مشابه SKL است. SKL از ترادف‌های توافق شده برای PTS1 محسوب می‌شود. یکی از دو سیگنال شناخته شده لازم برای انتقال پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی است (۱۹). با وجودی که این سیگنال در هدف‌یابی پراکسیزومی دخالت داشته و در طی تکامل حفاظت شده است، اما آزمایشات مختلف نشان می‌دهد که امکان جایگزینی اسیدآمینه لوسین با ایزولوسین در محل سومین اسیدآمینه وجود دارد. وجود AKI و SKI به عنوان سیگنال هدف‌یابی پراکسیزومی برای برخی از آنزیم‌ها در *Candida tropicalis* گزارش شده است (۲۰). به منظور بررسی اهمیت وجود تری‌پپتید SKI در انتهای پروتئین PeP، سازه EGFP-PeP/ΔSKI با استفاده از ایجاد یک cDNA شیمر، هدف‌یابی درون سلولی پروتئین هیبرید حاصله مورد بررسی

7. Fransen M, Vastiau I, Brees C, Brys V, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. Analysis of human Pex19p's domain structure by pentapeptide scanning mutagenesis. *J Mol Biol*. 2005; 346: 1275-1286.
8. Vizeacoumar FJ, Torres-Guzman JC, Bouard D, Aitchison JD, Rachubinski RA. Pex30p, Pex31p, and Pex32p form a family of peroxisomal integral membrane proteins regulating peroxisome size and number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2004; 15: 665-677.
9. Lazarow PB, Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol*. 1985; 1: 489-530.
10. Kashiwayama Y, Asahina K, Shibata H, Morita M, Muntau AC, Roscher AA, et al. Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1746: 116-128.
11. Schell-Steven A, Stein K, Amoros M, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Rottensteiner H, et al. Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import. *Mol Biol Cell*. 2005; 25(8): 3007-3018.
12. Saleem RA, Smith JJ, and Aitchison JD. Proteom-

- ics of the peroxisome. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763(12): 1541-1551.
13. Swinkels BW, Gould SJ, Bodnar AG, Rachubinski RA, Subramani S. A novel, cleavable peroxisomal targeting signal at the aminotermius of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase. *EMBO J*. 1991; 10: 3255-3262.
14. Ferrer-Martinez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR. Mouse PeP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Dev Dyn*. 2002; 224: 154-167.
15. Mcpherson, MJ, Moller, SG. PCR mutagenesis. 1st ed. New York: BIOS Scientific Publishers Limited; 2001; 143-180.
16. Tanhaie S, Ghaedi K, Karbalaii K, Razavi S, Ostadsharif M, Nazari-Jahantigh M, et al. Mouse PEP cDNA cloning and characterization of its intracellular localization. *Yakheth*. 2009; 11(42): 190-197.
17. Aronov A, Aranda G, Behar L, Ginzburg I. Axonal Tau mRNA localization coincides with Tau Protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *Neurosci*. 2001; 21(17): 6577-6587.
18. Ghaedi K, Fujiki Y. Isolation and characterization of novel phenotype CHO cell mutants defective in peroxisome assembly, using ICR191 as a potent mutagenic agent. 2008; 26: 684-691.
19. Elgersma Y, Vos A, van den Berg M, van Roermund CWT, van der Sluijs P, Distel B, et al. Analysis of the carboxyl-terminal peroxisomal targeting signal 1 in a homologous context in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1996; 271: 26375-26382.
20. Grant DF, Storms DH, Hammock BD. Molecular cloning and expression of murine liver soluble epoxide hydrolase. *J Biol Chem*. 1993; 268: 17628-17633.
21. Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. Multiple distinct targeting signals in integral peroxisomal membrane proteins. *J Cell Biol*. 2001; 153(6): 1141-1150.



## Cytosolic Localization of Mouse Peroxisomal Protein/ $\Delta$ SKI Fused with Enhanced Green Fluorescent Protein into Chinese Hamster Ovary-K1 and P19 Cells

Maryam Ostadsharif, M.Sc.<sup>1</sup>, Kamran Ghaedi, Ph.D.<sup>2,3\*</sup>, Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Somayeh Tanhaie, M.Sc.<sup>2</sup>, Khadijeh Karbalaii, M.Sc.<sup>2</sup>, Kazem Parivar, Ph.D.<sup>1</sup>, Hossein Baharvand, Ph.D.<sup>2,4,5</sup>

1. Islamic Azad University (IAU), Science and Research Branch, Tehran, Iran
2. Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
3. Biology Department, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
4. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran
5. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

\* Corresponding Addresses: P.O.Box: 19395-4644, Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran  
Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org  
mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 3/Aug/2008, Accepted: 28/Dec/2008

### Abstract

**Objective:** Amino acid alignment analysis of deduced amino acid residues revealed a tripeptide (SKI) at the carboxy terminus of peroxisomal protein cDNA. In order to see the importance of the above sorting signal, we have performed a site-directed mutagenesis to delete SKI tripeptide and its transfection into CHO-K1 and P19 cells.

**Materials and Methods:** In order to create the appropriate site-directed mutant, PCR was done with specific primers. Amplified PeP cDNAs either containing SKI or deleted ones were constructed downstream of EGFP cDNA under regulation of the cytomegalovirus (CMV) promoter in a pEGFP-C1 vector. Transfection of P19 and CHO cells was done with lipofectamine2000.

**Results:** Gradient PCR showed that the best annealing temperature was 71.6 °C. Transfection of plasmids containing chimera of EGFP-PEP cDNAs into the CHO-K1 and P19 cells showed several punctuate structures, presumably peroxisomes, while SKI deletion showed a cytosolic mislocalization of the EGFP pattern.

**Conclusion:** Taken together, these data strongly suggest that SKI, which is located at the C-terminus of the protein, is required for sorting this protein.

**Keywords:** Peroxisomal Protein, Peroxisome Targeting, Signal Peptide

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 154-159