

## کلون سازی cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع $\gamma 1$ موشی در وکتور بیانی pEGFP-C1

کامران قائدی<sup>\*\*\*</sup>، ثریا قاسمی<sup>\*</sup>، محمد حسین نصر اصفهانی<sup>\*\*</sup>، ابوالقاسم اسماعیلی<sup>\*</sup>، سمیه تنهایی<sup>\*\*</sup>،  
فرزانه ربیعی<sup>\*\*</sup>، خدیجه کربلایی<sup>\*\*</sup> و حسین بهاروند<sup>\*\*\*\*</sup>

\* دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

\*\* پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری رویان، گروه زیست‌شناسی سلولی و ملکولی

\*\*\* دانشگاه علم و فرهنگ تهران، گروه زیست‌تکوینی

\*\*\*\* پژوهشکده رویان تهران، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی

### چکیده

گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی عملکردهای گسترده‌ای در درون سلول دارد که می‌توان به تنظیم رشد و نمو سلولی، تنظیم پاسخ‌های ایمنی و تعادل انرژی و تنظیم مکانیسم تمایز سلولی در سلولهای بنیادی اشاره نمود. هدف از پژوهش حاضر، کلون نمودن cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی در وکتور بیانی EGFP-C1 است تا بتوان در مطالعات بعدی با انتقال آن به درون سلولهای بنیادی، مکانیسم و روند تمایز سلولی را مطالعه کنیم. پس از استخراج RNA کل سلول از بافت چربی موش بالغ، cDNA مربوطه تهیه شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر cDNA  $PPAR\gamma 1$  صورت گرفت. PEP cDNA تکثیر شده پس از هضم آنزیمی در پلاسמיד EGFP-C1 قرار گرفت. باکتری‌های One Shot TOP 10 با محصول اتصال پلاسמיד و cDNA  $PPAR\gamma 1$  ترانسفورم گردیدند و پس از کشت کلونی‌های مثبت حاوی پلاسמיד نوترکیب با آزمون PCR انتخاب و تکثیر گردیدند. پس از تأیید به وسیله آزمایش‌های هضم آنزیمی، تعیین توالی انجام شد. نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی اثبات کرد که قطعه تکثیر و کلون شده همان cDNA  $PPAR\gamma 1$  است. cDNA این ژن شامل ۱۴۲۸ جفت باز است.

واژه‌های کلیدی: گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی، حامل بیانی، کلون سازی

## مقدمه

گیرنده های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم (PPARs)، گروهی از گیرنده های هورمونی هسته ای، شامل سه نوع ایزوتایپ مختلف  $\text{PPAR}(\gamma/\beta/\delta, \alpha)$  هستند، که عملکرد آنها در سطح رونویسی است (۷). نقش اصلی این گیرنده ها در ارتباط با سوخت و ساز سلولی (کربوهیدرات، چربی و پروتئین) و تمایز سلولی است (۱۷). همچنین  $\text{PPAR}\gamma$  نقش مهمی در حساسیت به انسولین (insulin sensitivity)، همئوستازی بافتی (tissue homeostasis)، و تنظیم عملکردهای سلولی و تمایزبرعهده دارد (۱۸). از طرفی دیگر، این پروتئین، تنظیم کننده اصلی تمایز سلول های چربی است (۳). لوکوس ژن کد کننده این پروتئین در انسان، منطقه ژنی ۲۵ بر روی کروموزوم شماره ۳ (3P25) (OMIM 601487)، است (۹) و دو ایزوفرم آن،  $\text{PPAR}\gamma 1$  و  $\text{PPAR}\gamma 2$ ، در انسان و موش شناخته شده است (۴).

$\text{PPAR}\gamma$  ها، در انسان و موش، توسط تiazolidinediones (Thiazolidinediones) و پروستاگلاندین J، فعال می شوند (۴، ۶، ۱۲، ۱۴ و ۱۶). با استفاده از آزمایش نورترن بلات (Northern blot)، مشخص شده است که  $\text{PPAR}\gamma$  های موشی در بافت چربی، کبد، کلیه و قلب به میزان زیاد و در شش، بیضه ها، مغز، ماهیچه اسکلتی به میزان کمی بیان می شوند (۱۷ و ۲۱). 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 می گیرد (۴ و ۱۷). اخیراً مشخص شده است، با وجود بیان کم  $\text{PPAR}\gamma$  ها در مغز موش بالغ، در مغز جنین موش و سلول های بنیادی عصبی (NSCs) بیان بالایی دارد (۱۸). همچنین،

$\text{PPAR}\gamma$  ها در تنظیم تمایز ماکروفاژها، نقش دارند. ترکیبات طبیعی و ساختگی با تأثیرات مشابه  $\text{PPAR}\gamma$  (Agonists) با بازداشتن چندین عملکرد مربوط به فعالیت سلولهای میکروگلیال- که مهمترین جمعیت ماکروفاژهای دستگاه اعصاب مرکزی هستند- همچون بیان آنتی ژن های سطحی، سنتز نیتریک اکسید، پروستاگلاندین ها، سیتوکین های التهابی و شیموکین ها، از التهاب مغزی جلوگیری می کنند (۱). بنابراین، این ترکیبات قادر به جلوگیری از فعالیت سلول های ایمنی می گردند و می تواند برای درمان بیماری های نورودژنراتیو، همچون (MS) Multiple Sclerosis، بیماری های آلزایمر، پارکینسون و غیره هدف داروهای درمانی باشد (۱) و (۱۳). با کشف جهش های جدید در ژن این گیرنده و ناهنجاری های مربوط به آن ها، همچون دیابت، چاقی، لیپودستروپی و حتی سرطان هایی، همچون سرطان کولون و دیگر بافت ها، نقش های فراوان و اهمیت این ژن، بیشتر روشن می شود (۲ و ۵ و ۱۱ و ۱۹). با کلون کردن cDNA این ژن در یک وکتور بیانی مناسب و مطالعه آن در سلول های بنیادی عصبی و سایر سلولهای مورد مطالعه، می توان نقش این ژن را در پیشبرد تکامل این سلول ها در محیط آزمایشگاهی بررسی کرد. از طرفی، می توان در آینده با استفاده از کاربرد cDNA این ژن و بیان نمودن بالای آن در سلول های دخیل در بیماری های دژنراتیو مغزی، بدرستی به نقش و اهمیت این ژن در بهبودی این بیماری ها و مکانیسم مولکولی پیچیده ایجاد آن ها، پی برد. بنابراین، به نظر می رسد که کلون نمودن cDNA این ژن برای بررسی و مطالعات بعدی و مطالعه مکانیسم مولکولی و فعالیت آن ضروری باشد. بر این اساس، این مطالعه به منظور کلون نمودن

کلون سازی cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی در ... / ۱۸۳

در  $37^{\circ}\text{C}$  تیمار و از آن برای سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز (Fermentas, Lithuania) و الیگومرهای رندوم هگزامر (Fermentas, Lithuania) به عنوان پرایمر استفاده گردید. از آنجا که ژن بتاتوبولین در همه بافتها بیان دارد، تکثیر قسمتی از ناحیه بیان شونده این ژن به عنوان کنترل مثبت، برای بررسی کیفیت ساختار صحیح cDNA صورت گرفت. PCR برای این ژن با استفاده از یک میکرولیتر ( غلظت  $0.5\text{ ng/ml}$ ،  $0.25\ \mu\text{l}$  آنزیم EX-Taq (polymerase reverse (TaKaRa, Japan) و  $0.4\ \mu\text{M}$  از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse (جدول ۱) با برنامه دنا تورا سیون اولیه ۴ دقیقه در  $94^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد، و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب  $94^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،  $60^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،  $72^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام مرحله پایانی  $72^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه Thermal Cycler Eppendorf (Germany) انجام گردید. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شدند.

### ساخت و تکثیر cDNA PPAR $\gamma 1$

تکثیر قسمت کدشونده PPAR $\gamma 1$  به علت طول زیاد با روش SOE-PCR (Splice overlap extension PCR) در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول، طی دو PCR مجزا دو قطعه A و B تکثیر شدند. با استفاده از پرایمرهای PPAR $\gamma 1$ -F و PPAR $\gamma 1$ -R-1021 و *SacI* با طول ۱۰۳۳ جفت نوکلئوتید از ابتدای PPAR $\gamma 1$  cDNA و قطعه B به طول ۸۸۶ جفت نوکلئوتید از انتهای

cDNA مربوط به این ژن صورت گرفت.

مواد و روشها:

طراحی پرایمر و پلاسمیدها:

طراحی پرایمر با توجه به توالیهای cDNA *PPAR $\gamma 1$*  (NM\_001127330.1) و  $\beta$ -tubulin5 cDNA (NM\_0116550) استفاده از نرم افزار Oligo 6.2 انجام شد. پرایمرهای سنتز شده از شرکت Bioneer (Korea) با واسطه شرکت تکاپو زیست خریداری شد؟ (جدول شماره ۱). دوپلاسمید pEGFP- (Clontech, USA; catalog #6084-1) C1 (GenBank Accession #: U55763) و پلاسمید T-vector (pTZ57R/T) نیز جهت این پژوهش خریداری گردید. (Fermentas, Lithuania)

### مدل حیوانی و استخراج RNA:

پس از جداسازی بافت چربی از یک موش نژاد سوری، بافت قطعه قطعه گردید و با سرم فیزیولوژی سرد شستشو داده شد. به قطعات بافتی مذکور یک میلی لیتر از محلول RNX-PLUS (سیناژن، ایران) اضافه و کل RNA سلولی به وسیله کیت مذکور استخراج شد. غلظت RNA تخلیص شده با دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی و کیفیت RNA مورد نظر با الکتروفورز افقی نیز بررسی گردید.

### سنتز cDNA و RT-PCR:

ابتدا ۲ میکروگرم RNA استخراج شده جهت حذف آلودگی با DNA ژنومی، با آنزیم *DNase I* (Fermentas, Lithuania) به مدت ۳۰ دقیقه

داده شد. ۴۰ میکرولیتر X-gal (Sigma, USA) IPTG (Sigma, ۲۰mg/ml) و ۴۰ میکرولیتر (۲۳/۸۳mg/ml)(USA) نیز به محیط کشت اضافه شد تا بتوان از سیستم غربالگری سفید-آبی، با توجه به وجود اوپران LacZ در این پلاسمید، بهره برد. پس از گذشت حدود ۱۶ ساعت کلونی های سفید با PCR بررسی شدند. از آنجا که احتمال ورود قطعه درون وکتور به دو صورت همخوانش و غیر همخوانش در راستای جهت خوانش ژن LacZ در ساختار وکتور وجود داشت، به منظور بررسی نحوه جهت گیری قطعه کلون شده در وکتور، کلونی های سفید در دو واکنش PCR جداگانه با جفت پرایمرهای (پرایمر مربوط به وکتور) T7-F و PPAR $\gamma$ -R-575 ارزیابی شدند که در صورت ورود قطعه درون وکتور به صورت هم جهت با جهت خوانش ژن LacZ محصول حاصله ۶۴۷ جفت باز طول خواهد داشت. ضمناً در صورت ورود بر خلاف جهت خوانش ژن LacZ کلنی های حاصله با پرایمرهای (پرایمر مربوط به وکتور) M13 و PPAR $\gamma$ -R-575 ارزیابی شدند (نتایج نشان داده نشده است).

#### تعیین توالی :

از چند کلونی که نتایج PCR آنها مثبت بود، پلاسمید استخراج گردید. برای اطمینان از صحت ترادفهای PPAR $\gamma$ 1 cDNA کلون شده در درون پلاسمید و جهت اطمینان در عدم جهش در توالی آن، برای تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 1-F-SacI, PPAR $\gamma$ 1-F-552 -1000-F و T7-F، به واسطه شرکت تکاپوزیست (تهران) به شرکت Bioneer ارسال گردید.

PPAR $\gamma$ 1 cDNA با پرایمرهای PPAR $\gamma$ 1-F-552 و تکثیر شدند. از آنجا که طول PPAR $\gamma$ 1 cDNA، ۱۴۲۸ نوکلئوتید است، این دو قطعه شامل ۴۶۹ جفت نوکلئوتید همپوشان هستند. در این دو PCR از یک میکرولیتر cDNA سنتز شده به عنوان الگو استفاده شد. پس از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱٪ باند مورد نظر باکیت استخراج از ژل شرکت کیاژن (Qiagen, Germany)، تخلیص شد. در مرحله دوم از قطعات A و B به عنوان الگو در یک واکنش PCR که شامل پرایمرهای PPAR $\gamma$ 1-F-SacI و PPAR $\gamma$ 1-R-KpnI نیز بود، در یک واکنش PCR استفاده شد و کل قطعه PPAR $\gamma$ 1 cDNA تکثیر گردید. غلظت محصول PCR پس از تخلیص با کیت استخراج از ژل شرکت کیاژن، تعیین و در وکتور pTZ57R/T (Fermentas, Lithuania) کلون شد.

#### کلون سازی cDNA PPAR $\gamma$ 1 در pTZ57R/T :

طبق دستورالعمل کیت مخلوط ۳۰ میکرولیتری شامل ۳ میکرولیتر pTZ57R/T (غلظت) pmol، ۰/۱۸ میکرولیتر بافر اتصال، یک میکرولیتر T4 DNA ligase (Fermentas, Lithuania) و ۰/۵۴ pmol محصول PCR (قطعه PPAR $\gamma$ 1 cDNA) تهیه و در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پنج میکرولیتر از محصول اتصال برای ترانسفورم کردن باکتریهای مستعد (Invitrogen, USA) TOP 10، به روش شوک حرارتی، استفاده شد. از آنجا که پلاسمید pTZ57R/T حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است، محصول ترانسفورم روی محیط کشت جامد حاوی آمپی سیلین کشت

کلون سازی cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی در ... / ۱۸۵

کیفیت بالای RNA تخلیص شده است. در شکل ۱-ب، باند ۳۱۸ جفت باز در شکل مربوط به PCR قطعه ای از cDNA ژن بتاتوبولین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی است که نشان دهنده صحت و کیفیت مراحل تهیه RNA است.

### تکثیر cDNA PPAR $\gamma 1$

مرحله اول تکثیر cDNA PPAR $\gamma 1$  به صورت دو قطعه همپوشان A و B با موفقیت انجام شد و باندهای مدنظر ۱۰۳۳ و ۸۸۶ جفت باز به دست آمد (شکل ۲-الف). طول قطعه حاصل از مرحله دوم PCR (شکل ۲-ب) دقیقاً با طول گزارش شده برای cDNA PPAR $\gamma 1$  موشی در بانک‌های ژنی (۱۴۲۸ جفت باز) مطابقت داشت.

### ساخت پلاسمید pTZ57R/T حاوی

#### PPAR $\gamma 1$ cDNA

ترانسفورم کردن باکتریها با محصول اتصال cDNA PPAR $\gamma 1$  و وکتور pTZ57R/T به تولید دو نوع کلونی سفید و آبی رنگ روی پلیت های باکتریایی منجر گردید. نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از کلونی های سفید نشان دهنده ورود قطعه cDNA PPAR $\gamma 1$  به صورت هم جهت با قالب خوانش ژن LacZ در یکی از کلونی ها بود که محصول PCR باند مورد انتظار ۶۴۷ جفت بازی را نشان داد (شکل شماره ۳).

### نتایج تعیین توالی:

با مقایسه نتایج تعیین توالی پلاسمید استخراج شده از کلونی مزبور با توالی cDNA PPAR $\gamma 1$  موشی موجود در بانک ژنی (شکل ۴) صحت کلون سازی

### ساخت پلاسمید بیانی حامل EGFP-PPAR $\gamma 1$ :

جایگاه برش آنزیمهای SacI و KpnI در سمت ۵' پرایمرهای PPAR $\gamma 1$ -F-SacI و PPAR $\gamma 1$ -R-KpnI طراحی شده بود. بنابراین، پس از تکثیر cDNA PPAR $\gamma 1$  با پرایمرهای مذکور، این جایگاهها به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' قطعه قرار داشتند. بر این اساس، وکتور نوترکیب PPAR $\gamma 1$  cDNA pEGFP- و پلاسمید بیانی pEGFP- SacI با دو آنزیم C1 (Clontech, USA) و KpnI مورد برش قرار گرفتند. به این ترتیب، قطعه cDNA خالص شده در پلاسمید pEGFP-C1 در جایگاه آنزیم های مذکور قرار گرفت. عمل اتصال قطعه تکثیر یافته در پلاسمید بیانی با استفاده از کیت Ligation شرکت TaKaRa (Japan) طبق پروتوکل کیت مربوطه انجام شد. باکتریهای TOP10 به روش شوک حرارتی با پلاسمید حاصله ترانسفورم گردیدند. از بین کلونی های رشد کرده بر روی محیط کشت 2YT حاوی کانامایسین  $30 \mu\text{g/ml}$  UKGIBCO، کلونی های حاوی پلاسمید با استفاده از واکنش PCR با پرایمرهای (پرایمر مربوط به وکتور) pEGFP-C1-F و PPAR- $\gamma 1$ -R-575 انتخاب شدند.

### یافته ها و نتایج

#### جدا نمودن RNA کلی سلول و RT-PCR:

همان طور که در شکل ۱-الف نشان داده شده است، به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده از بافت چربی، بخشی از نمونه استخراج شده RNA الکتروفورز گردید و باندهای ۲۸S، ۱۸S، ۵S RNA ریوزومی بوضوح دیده شد که نشان دهنده

انجام پذیرفت. این روش قبلا نیز جهت کلون سازی PPAR $\gamma$ 1 cDNA کوچک هندی به کار گرفته شده است (۱۰). به دلیل آن که ایزوفرم اول ژن PPAR $\gamma$ 1 در بافت چربی بیان بالایی دارد (۲۰) در پژوهش حاضر، از بافت چربی موش برای جداسازی RNA تام بهره گرفته شد. PPAR $\gamma$  عضوی از خانواده گیرنده های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم ها (PPARs) است. این خانواده، گروهی از فاکتورهای رونویسی هستند که از گیرنده های هورمونی درون هسته ای محسوب می شوند (۱۸ و ۱۷). PPAR $\gamma$  دارای طیف وسیعی از لیگاندهای طبیعی و سنتتیک است. با توجه به نقش گسترده ای که این لیگاندها با هدف قراردادن PPAR $\gamma$  در بهبود برخی مشکلات متابولیسمی دارند (۲۱) می توان با مطالعات مولکولی بیشتر این گیرنده، مسیرهای منجر به ناهنجاری و بیماریهای حاصل از جهش های این گیرنده و نقش لیگاندها در بهبود این اختلالات، را شناسایی نمود. مشخص شده است که PPAR $\gamma$ ، در طی رشد و تکامل جنینی دارای نقش است. همچنین محصول این ژن در بسیاری از عملکردهای مهم سلولی در افراد بالغ دارای نقش های حیاتی است (۱۸). گفته می شود که PPAR $\gamma$  در سلولهای عصبی در دوران جنینی بیان زیادی دارد و احتمالاً در تمایز این سلولها دارای نقش است. با ترانسفکت نمودن پلاسمید بیانی حامل cDNA و افزایش بیان آن در سلولهای بنیادی و فراهم نمودن شرایط تمایز به سمت عصب، می توان نقش افزایش بیان این ژن را در این فرایند دقیقتر بررسی نمود. همچنین، از آنجا که مسیر برگشت این گیرنده درون هسته ای، از هسته به سیتوپلاسم، پس از اتمام عمل این گیرنده در هسته، بدرستی مشخص نیست، می توان با بررسی های دقیقتر دامنه های مختلف

توالی قطعه وارد شده و عدم وجود جهش در قطعه کلون شده به اثبات رسید.

### هضم آنزیمی و انتقال PPAR $\gamma$ 1 در وکتور بیانی pEGFP-C1

همان طور که در شکل ۵ مشخص است، قطعه وارد شده در پلاسمید pTZ57R/T با انجام هضم آنزیمی توسط دو آنزیم محدودالتر *KpnI* و *SacI* طی دو مرحله، خارج شد. از طرفی، در نتیجه این هضمهای آنزیمی، پلاسمید pEGFP-C1، نیز خطی شده، دارای انتهای چسبنده گردید. به دنبال هضم آنزیمی و جدا سازی قطعه PPAR $\gamma$ 1 cDNA، با انجام فرآیند اتصال داخل وکتور pEGFP-C1 قرار گرفت. تصویر شماره ۶، نتیجه colony PCR بر روی کلنی های باکتریایی رشد یافته پس از ترانسفورم کردن باکتریها با محصول اتصال PPAR $\gamma$ 1 cDNA و وکتور pEGFP-C1 را که وجود قطعه PPAR $\gamma$ 1 cDNA را در پلاسمید بیانی-pEGFP-C1 اثبات می کند.

### بحث:

روش SOE-PCR، ابزار مناسبی برای کلون نمودن و تغییر سکانس های ژن هدف است (۸). این روش قبلا نیز توسط ما جهت ساخت سازه های مختلف PEP cDNA موشی به کار گرفته شده بود (۱۵). از آنجا که استراتژی کلون سازی با استفاده از وکتوری بیانی، روش مؤثری در درک فعالیت ژن های مختلف است، بنابراین، برای مطالعات بیشتر، این تحقیق با هدف کلون نمودن cDNA موشی ایزوفرم اول ژن PPAR $\gamma$ 1 در وکتوری بیانی در سلولهای یوکاریوتی (pEGFP-C1) با روش SOE-PCR

**Refrecencs**

A., Bernardo, and L., Minghetti. PPAR- $\gamma$  agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation. *Current Pharmaceutical Design*. 12, 93-109. (2006).

S., Campbell, W., Stone, S., Whaley, M., Qui, and K., Krishnan. Gamma ( $\gamma$ ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma ( $\gamma$ ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BCM Cancer*. 3, 1-13. (2003).

S., Drori, G., Girnun, L., Tou, J., Szwaya, E., Mueller, X., Kia, R., Shivdasani, and B., Spiegelman. Hic-5 regulates an epithelial program mediated by PPAR $\gamma$ . *Gene & Development*. 19, 362-375. (2005).

L., Fajas, D., Auboeuf, E., Raspe, K., Schoonjans, A., Lefebvre, R., Saladin, J., Najib, M., Laville, J., Fruchart, S., Deeb, A., Vidal-Puig, J., Flier, M., Briggs, M., Staels, H., Vidal, and J., Auwerx. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR $\gamma$  gene. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 18779-18789. (1997).

H., Freake. A genetic mutation in PPAR gamma is associated with enhanced fat cell differentiation: implications for human obesity. *Nutrition reviews*. 57, 154-156. (1999).

M., Heneka, T., Klockgether, and D., Feinstein. Peroxisome proliferator-activator- $\gamma$  ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo. *Journal of Neuroscience*. 20, 6862-6867. (2000).

آن، توالی های اسید آمینه ای از این پروتئین را که در این زمینه نقش دارند، را شناسایی نمود و مکانیسم این فرایند را به طور واضحتری درک نمود. در پژوهش حاضر، از ژن نشانگر EGFP در بالادست PPAR $\gamma 1$  بهره برده شد، که با ترانسفکت نمودن پلاسמיד نوترکیب حاصل، و تولید پروتئین نوترکیب EGFP-PPAR $\gamma 1$  می توان صحت عملکرد و جایگیری درون هسته ای آن را بررسی نمود. از آنجا که PPAR $\gamma$  فاکتوری رونویسی و گیرنده ای درون هسته ای است، انتظار داریم به دنبال ترانسفکت نمودن این سازه در داخل سلول های جانوری پروتئین نوترکیب در هسته مشاهده شود. از این رو، امید است، با کلون نمودن ایزوفرم اول این گیرنده، آغازگر مجموعه ای از مطالعات و بررسی های مولکولی و بالینی بر روی این گیرنده مهم درون هسته ای باشیم.

**تقدیر و تشکر:**

هزینه های انجام این پروژه از طرح مصوب پژوهشکده رویان با شماره طرح ۵-۱۴۸ تأمین گردید.

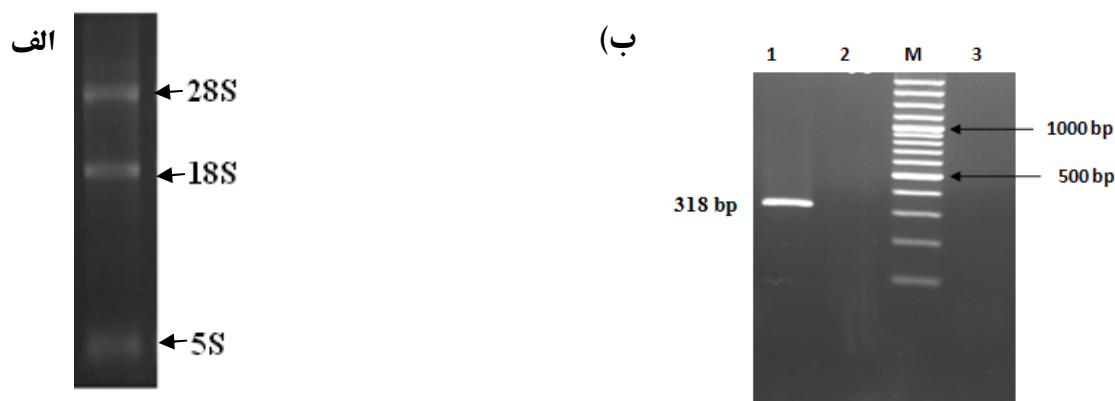
- A., Hihi, L., Michalik, and W., Wahli. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59, 790-798. (2002).
- M., Jones, A., Warrens, and R., Lechler. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene*. 186, 29-35. (1997).
- C., Ko, T., Lee, P., Lau, J., Li, B., Davis, E., Voyiaziakis, D., Allison, S., Chua, and L., Huang. Two novel quantitative trait loci on mouse chromosomes 6 and 4 independently and synergistically regulate plasma apoB levels. *Journal of Lipid Research*. 42, 844-855. (2001).
- B.Y., Khoo, M.R., Samian, N., Najmudin, and T.S., Tengku-Muhammad. Molecular cloning and characterisation of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma1) cDNA gene from guinea pig (*Cavia porcellus*): tissue distribution. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry*. 134(1), 37-44. (2003).
- H., Koutnikova, T., Cock, M., Watanabe, S., Houten, M., Champy, A., Dierich, and J., Auwerx. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypermorphic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100, 14457-14462. (2003).
- O., Lazarenkoa, S., Rzonca, L., Suva, and B., Lecka-Czernik. Netoglitazone is a PPAR-gamma ligand with selective effects on bone and fat. *Bone*. 38, 74-84. (2006).
- B., Liu. Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of parkinson's disease. *The AAPS Journal*. 8, 606-621. (2006).
- S., Narumiyal, and G., FitzGerald. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *The Journal of Clinical Investigation*. 108, 25-30. (2001).
- M., Ostadsharif, K., Ghaedi, M.H., Nasr-Esfahani, S., Tanhaie, K., Karbalaii, and H., Baharvand. Peroxisomal sorting analysis of mouse peroxisomal protein by invitro studies. *Iranian Journal of Biotechnology*. (2009). Submitted.
- C., Thiemermann. Ligands of the Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and heart failure. *British Journal of Pharmacology*. 141, 1-3. (2004).
- A., Vidal-Puig, R., Considine, M., Jimenez-Linan, A., Werman, W., Pories, J., Caro, J. and J., Flier. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. *The Journal of Clinical Investigation*. 99, 2416-2422. (1997).
- K., Wada, A., Nakajima, K., Katayama, C., Kudo, A., Shibuya, N., Kubota, Y., Terauchi, M., Tachibana, H., Miyoshi, Y., Kamisaki, T., Mayumi, T., Kadowaki, and R., Blumberg. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 281, 12673-12681. (2006).



- T., Willson, M., Lambert, and S., Kliewer. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and metabolic disease. Annual Review of Biochemistry. 70, 341-367. (2001).
- J.W., Woods, M., Tanenb, D.J., Figueroa, C., Biswas, E., Zychband, D.E., Moller, C.P., Austinc, and G.P., Berger. Localization of PPAR $\gamma$  in murine central nervous system: expression in oligodendrocytes and neurons. Brain Research. 975, 10-21. (2003).
- Y., Zhu, K., Alvares, Q., Huang, M., Rao, and J., Reddy. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. Journal of Biological Chemistry. 268, 26817-26820. (1993).

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده با نرم افزار **Oligo 6** و طول محصول مورد نظر تولید شده با آن ها.

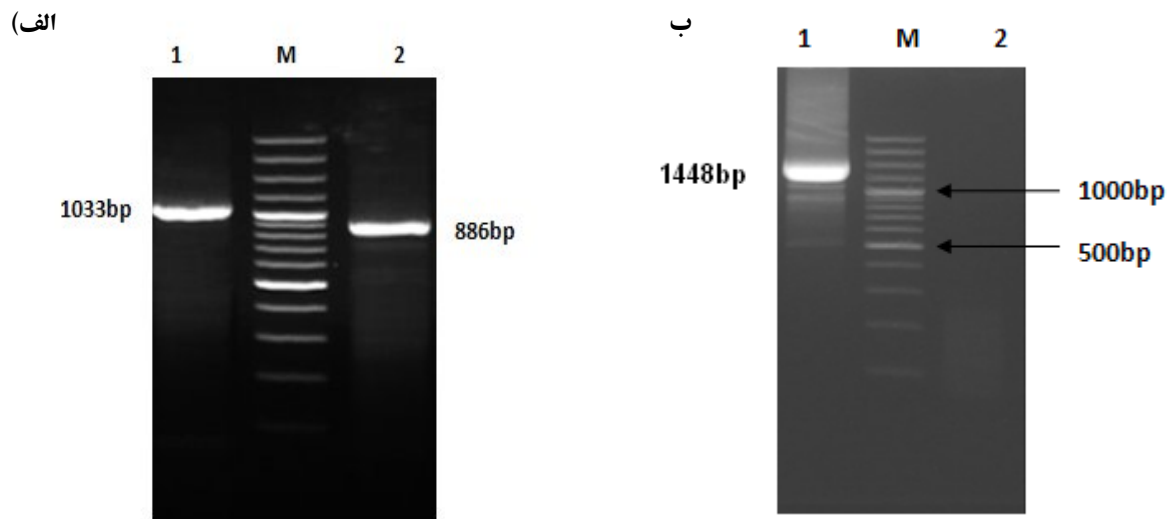
PRIMER NAME		PRIMER SEQUENCE	Product length (bp)	Annealing temperature For PCR
Beta tubulin	F	5'-TCACTGTGCCTGAACTTACC-3'	318bp	63°C
Beta tubulin	R	5'-GGAACATAGCCGTAAGTGC-3'		
PPAR $\gamma$ 1- <i>SacI</i>	F	5'- ATTTGAGCTCAAGTTGACACAGAGATGCC ATTCTG-3' <i>SacI</i>	1033bp	65°C
PPAR $\gamma$ 1-1021	R	5'-GATGGAGTCCTCATCTCAGAGG-3'		
PPAR $\gamma$ 1-552	F	5'-GCCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCC-3'	886bp	60°C
PPAR $\gamma$ 1- <i>KpnI</i>	R	5'- AATTGGTACCCTAATACAAGTCCTTGTAG ATC -3' <i>KpnI</i>		
PPAR $\gamma$ 1- <i>SacI</i>	F	5'- ATTTGAGCTCAAGTTGACACAGAGATGCC ATTCTG-3' <i>SacI</i>	1448 bp	70°C
PPAR $\gamma$ 1- <i>KpnI</i>	R	5'- AATTGGTACCCTAATACAAGTCCTTGTAG ATC-3' <i>KpnI</i>		
pEGFP-C1	F	5'-AACGAGAAGCGCGATCACATGC-3'	661bp	63°C
PPAR $\gamma$ 1-575	R	5'-GGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTGGC-3'		



شکل ۱- مراحل استخراج RNA و بررسی ساخت cDNA.

الف) استخراج RNA از بافت چربی موش. ۱) سه باند RNA ریبوزومی. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas, Lithuania). ب) بررسی ساخت cDNA. ۱- باند مشاهده شده، اندازه توالی قطعه ای از cDNA بتا توبولین را نشان می دهد و صحت ساخت cDNA را اثبات می گرداند؛ ۲- نمونه کنترل منفی فاقد RNA. در این واکنش از آب مقطر به عنوان الگو در واکنش PCR بهره برده شد؛ ۳- نمونه کنترل منفی فاقد آنزیم Reverse Transcriptase که در مرحله سنتز cDNA به آن اضافه نشده بود. M) مارکر ۱۰۰ جفت باز (Fermentas, Lithuania).

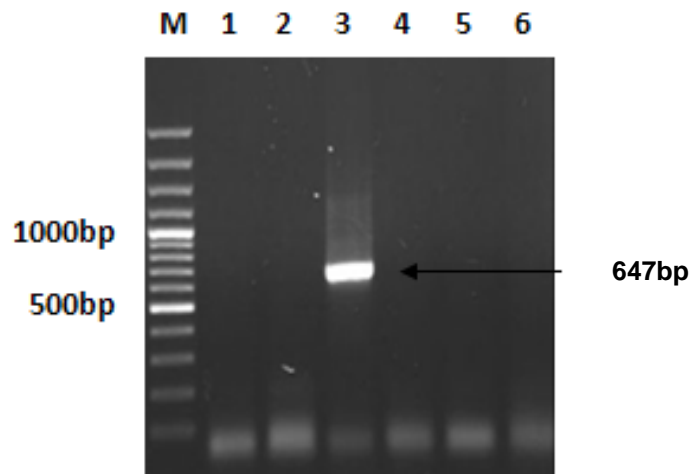
کلون سازی cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی در ... / ۱۹۱



شکل ۲: مراحل تکثیر قطعات cDNA  $PPAR\gamma 1$ .

الف): قطعات حاصل از PCR مرحله اول در تکثیر  $PPAR\gamma 1$  cDNA. ۱- تکثیر ۱۰۳۳ جفت باز از سمت ۵' که با استفاده از پرایمرهای  $PPAR\gamma 1$ -F-*SacI* و  $PPAR\gamma 1$ -R-1021 تکثیر شده است؛ ۲- تکثیر ۸۸۶ جفت باز از سمت ۳' که با پرایمرهای  $PPAR\gamma 1$ -F-552 و  $PPAR\gamma 1$ -R-*KpnI* تکثیر شده است. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas). اندازه قطعات مارکر همانند مورد مشابه ذکر شده در شکل ب است.

شکل ب) قطعه نهایی تکثیر  $PPAR\gamma 1$  cDNA. ۱- قطعه نهایی سنتز شده با استفاده از پرایمرهای  $PPAR\gamma 1$ -F-*SacI* و  $PPAR\gamma 1$ -R-*KpnI*. قطعات محصول مرحله پیش به عنوان الگو در این مرحله از PCR استفاده شدند. ۲- نمونه کنترل منفی: در این واکنش از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی استفاده شد. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas).



شکل ۳- نتیجه colony PCR برای شناسایی کلونی های دارای پلاسمید pTZ57R/T حامل قطعه مستقیم  $PPAR\gamma 1$  را نشان می دهد. در این آزمایش از پرایمرهای T7-F و  $PPAR\gamma$ -R-575 استفاده شد. ۱ الی ۶: نتایج PCR بر روی ۶ کلونی باکتریایی انتخاب شده. کلونی شماره ۳، حاوی پلاسمید مورد نظر است. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas).

الف

atgggttgacacagaga tggcattctggcccaccaa cttcggaatcagctctgtggaccctc  
tccgtgatgggaagaccactcgca ttcctttgacatcaagccctttacca cagttgatttc  
tccagcatttctgctcca cacta tgaagacat tccat tcaca agagctgaccca atggtt  
gctgattacaa atatgacctgaa gctccaa gaata ccaa agtgcgat caaagta gaacct  
gcatctccaccttattat tctgaaa agaccagctctacaacaggcctcat gaagaacct  
tctaactccctc atggccat tga gttgcgagctctgtggggat aaagcatcaggcttccac  
tatggagttca tggcttgtgaaggat gcaagggttttttc cgaagaacca tccgattgaag  
cttatttatgata ggtgtgactta actgccggat ccacaaaaaagtaga aataa atgt  
cagtactgtcgggttccagaa gtcctt gctgtgggga tgtctca caatgccatcagggtt  
gggaggatgccacaggccga gaa ggagaagctgttggcggagatctccagtgat atcgac  
cagctgaaccagagctctgctgatactg cga gccctggca aagcattt gtatgactcat ac  
ataaagtccttcccgctgaccaa agccaaggcggaggcgatcttgacaggaaagacaa cg  
gacaaatcaccat ttgtcatcta cgacatgaa ttcctta atgatgggagaa gataaaa tc  
aagttcaaaca tataccccctgcaggagcagagca aagaggtggcca tccgaatttt  
caagggtgcca gtttcgataccgt agaa gccgtgca agagatcacagagat gccaaaa at  
atccctggttt cattaacctgatt tgaatgac caa agtgactctgctca agtatgggtgtc  
catgagatcatctaca cgatgctggcctccctgat gaataaaga tggagtcctcatctca  
gagggccaaggat tca tga ccaggagggttctcaaaa gcctg cggaa gcccttggtgac  
tttatggagccta agttgagtttgctgtgaa gttca atgca ctgga attagatgacagt  
gacttggctat attta tagctgtcattattctc agtgga gaccgcccaggcttgctgaac  
gtgaagcccatcgaggacatcca agacaacctgctgcaggccctgga actgcagctcaag  
ctgaatcaccagagctcctctcagctgttccgca aggtgctccagaaga tgacaga cctc  
aggcagatcgtca cagagca cgtgcagcta ctgca tgtgatca a gaa ga cagagacagac  
atgagccttca cccccgtctcca ggagatcta caaggacttgta ttag

ب

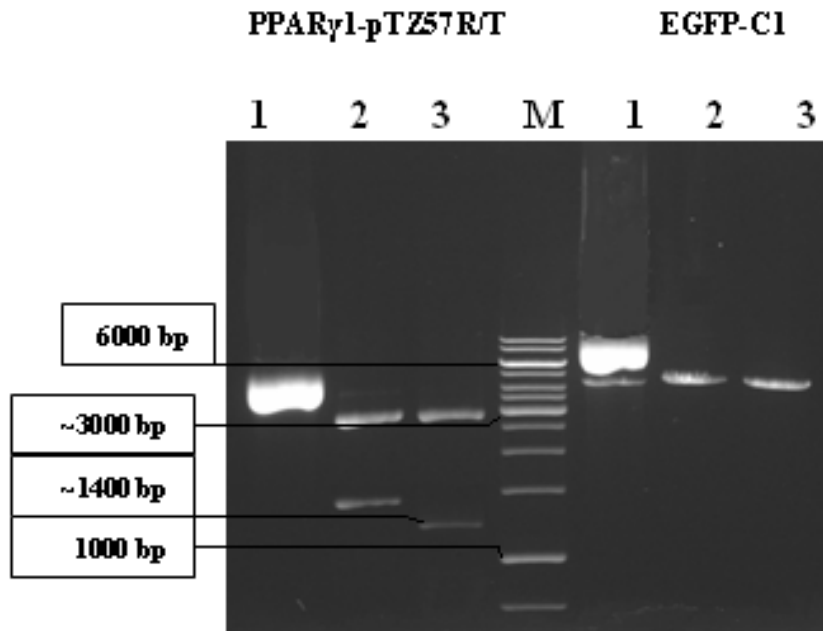
MVDTEMPFWPTNFGI SSVDL SVMEDHSHS FDIKPFTTVD FSSIS  
APHYEDI PFTRAD PMVADYKYDLKLQE YQSAI KVEPASP PYYSEKTQL YNR PHEEPSN  
SLMAIECRVCGDKAS GFHYGVHACE GCKGFFRRT IRLKLI YDRC DLNCR IHKKS RNKC  
QYCRFQKCLAVGMSHNA IRFGRMPQAE KEKLLAE IS SDI DQLNPES ADLRLALAKHL YD  
SYIKSFPLTKAKARA ILTGKTT DKS PFVI YDMNS LMMGE DKIKFKH IT PLQEQSKEVA  
IRIFQGCQFRSVEAVQE ITE YAKNI PGFINLDLNDQVTL LKYGVHE I IYTMLASLMNK  
DGVLI SEGQGFMTRE FLKSLRKPFGDFME PKFEFAVKFNAL ELDDSDLAI FIAVII LS  
GDRPGLLNKPIEDI QDNLLQALELQLKLNHPES SQLFAKVLQKMT DLRQIVTEHVQL  
LHVIKKTETDMSLHPLLQEI YKDLY

شکل ۴- توالی cDNA PPAR $\gamma$ 1 موشی و پروتئین به دست آمده موجود در بانک ژنی.

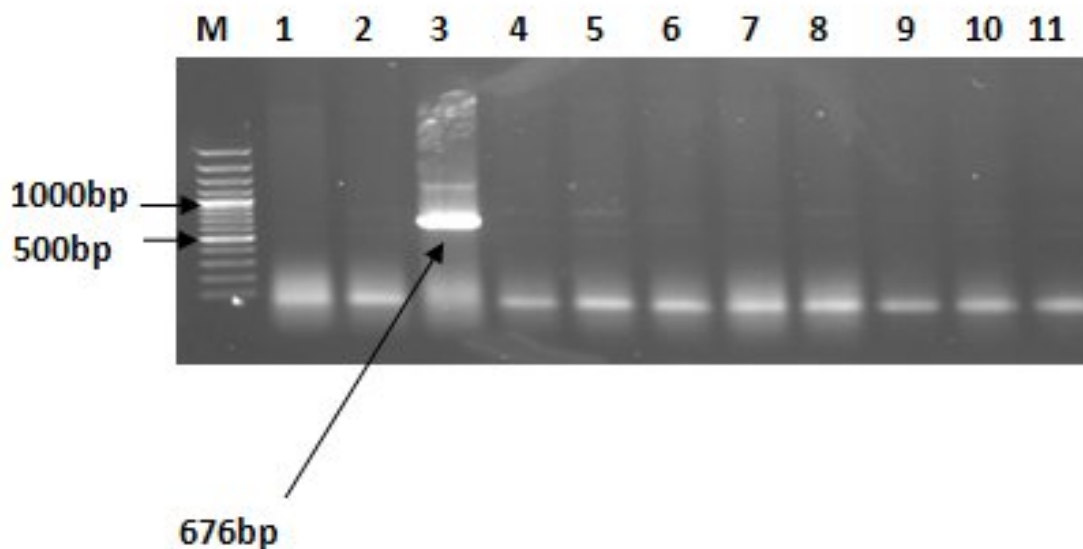
الف) توالی بازهای PPAR $\gamma$ 1 cDNA.

ب) توالی اسیدهای آمینه موجود در ساختار پروتئین PPAR $\gamma$ 1.

کلون سازی cDNA گیرنده فعال کننده پراکسی زومی نوع  $\gamma 1$  موشی در ... / ۱۹۳



شکل ۵- مراحل هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T حامل قطعه cDNA PPAR $\gamma 1$  و خروج قطعه از آن و هضم آنزیمی پلاسمید pEGFP-C1. هضم آنزیمی در ابتدا با آنزیم *SacI* و در مرحله دوم با *KpnI* انجام شده است. ۱- محصول هضم نشده؛ ۲- محصول با یک آنزیم هضم شده؛ ۳- محصول با هر دو آنزیم هضم شده است. (M) مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی (Fermentas).



شکل ۶- نتیجه colony PCR برای شناسایی کلونی باکتریایی دارای پلاسمید pEGFP-C1 حامل PPAR $\gamma 1$ . ۱ الی ۱۱: نتایج PCR بر روی ۱۱ کلونی باکتریایی انتخاب شده. کلونی شماره ۳ دارای پلاسمید مذکور است. (M) مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی (Fermentas).

