

## Mouse Peroxisomal Protein cDNA Cloning and Characterization of its Intracellular Localization

Somayeh Tanhaie, M.Sc.<sup>1</sup>, Kamran Ghaedi, Ph.D.<sup>1,2\*</sup>, Khadijeh Karbalaii, M.Sc.<sup>1</sup>,  
Shanaz Razavi, Ph.D.<sup>3</sup>, Maryam Ostadsharif, M.Sc.<sup>1,4</sup>, Maliheh Nazari-Jahantigh, B.Sc.<sup>1,2</sup>,  
Farzaneh Rabeei, B.Sc.<sup>1</sup>, Marziyeh Nematollahi, B.Sc.<sup>1</sup>, Hossein Baharvand, Ph.D.<sup>5</sup>,  
Mohammad Hossein Nasr Esfahani, Ph.D.<sup>1\*</sup>

1. Cell and Molecular Biology Department, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Biology Department, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
3. Anatomy Department, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4. Basic Medical sciences Department, School of Midwifery and Nursing, Islamic Azad University (Khorasgan Branch), Khorasgan, 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

Email: kamranghaedi@royaninstitute.org  
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

Received: 3/Apr/2008, Accepted: 21/Sep/2008

### Abstract

**Objective:** The aim of this study was to clone peroxisomal protein (PEP) cDNA in a mammalian expression vector in a chimeric cDNA type, with enhanced green fluorescent protein (EGFP) cDNA. To investigate the intracellular localization of PEP protein linked to EGFP marker, the constructed plasmid was used for transfection into the chinese hamster ovary (CHO) cells.

**Materials and Methods:** Total RNA was extracted from the heart tissue of an adult mouse. PEP cDNA was constructed using reverse transcriptase and was amplified with specific primers covering the entire length of ORF. RT-PCR products containing PEP cDNA were treated by enzymatic digestion and inserted into the pEGFP-C1 downstream of EGFP cDNA and were used for transformation into bacterial competent cells. The positive colonies which showed inserted PEP cDNA were selected for plasmid preparations and additional analysis was performed to ensure that PEP cDNA was inserted properly. Finally, to confirm the intracellular localization of EGFP-PEP, CHO cells were transfected with the constructed plasmid.

**Results:** Our results confirmed amplification and cloning of the expected product. PEP cDNA encompasses 630 bp which encodes 209 amino acid residues. Bioinformatics analyses have shown the presence of a fibronectin type III domain (31-114 a.a.) and two hydrophobic domains (12-32 a.a. and 152-169 a.a., respectively). Because of the presence of serine, Lysine, leucine (SKI) in the C-terminal of the related protein, transfection data showed peroxisomal localization of PEP as was similar to the catalase.

**Conclusion:** Taken together these data showed that PEP is a peroxisomal protein. However the importance of its fibronectin type III and two hydrophobic domains should be assessed by further experiments.

**Keywords:** Fibronectin, Peroxisome, Peroxisome Targeting Signal 1

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 196-203

## کلونینگ cDNA پروتئین پراکسیزومی موش و بررسی جای گیری درون سلولی آن

سمیه تنهایی<sup>۱</sup>، M.Sc.؛ کامران قائدی<sup>۲،۱</sup>، Ph.D.؛ خدیجه کربلایی<sup>۱</sup>، M.Sc.؛ شهناز رضوی<sup>۲</sup>، Ph.D.؛ مریم اسناد شریف<sup>۱،۲</sup>، M.Sc.؛ ملیحه نظری جهان تیغ<sup>۱</sup>، B.Sc.؛ فرزانه ربیعی<sup>۱</sup>، B.Sc.؛ مرضیه نعمت اللهی<sup>۱</sup>، B.Sc.؛ حسین بهاروند<sup>۱</sup>، Ph.D.؛ محمد حسین نصر اصفهانی<sup>۱</sup>، Ph.D.\*

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، اصفهان، ایران

۲. دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران

۳. دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، اصفهان، ایران

۴. دانشگاه آزاداسلامی، واحد خوراسگان، دانشکده پرستاری و مامایی، گروه علوم پایه پزشکی، اصفهان، ایران

۵. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران

\* آدرس نویسندگان مسئول: اصفهان، ایران، صندوق پستی: ۴۴۶۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

پست الکترونیکی: Emails: kamranghaedi@royaninstitute.org

mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۷/۱/۱۵، پذیرش مقاله: ۸۷/۱/۳۱

## چکیده

\* هدف: کلون نمودن cDNA پروتئین پراکسیزومی در پلاسمید یوکاریوتی بیانی EGFP-C1 و بررسی الگوی بیان ژن PEP (Peroxisomal Protein) متصل به مارکر پروتئین سبز فلورسانس در سلول تخمدان خوکچه هندی

\* مواد و روش‌ها: پس از استخراج RNA کل سلول از قلب موش بالغ، cDNA مربوطه تهیه شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر cDNA PEP صورت گرفت. cDNA PEP تکثیر شده پس از هضم آنزیمی در پلاسمید EGFP-C1 قرار گرفت. باکتری‌های ۱۰ One Shot TOP با محصول اتصال پلاسمید و cDNA PEP ترانس فورم گردید و پس از کشت کلونی‌های مثبت دارای پلاسمید نو ترکیب با آزمون PCR انتخاب و تکثیر گردیدند و بر روی پلاسمید خالص شده از آنها تست‌های هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام شد. برای بررسی الگوی بیان PEP درون سلول‌های CHO، این سلول‌ها با ۴ میکروگرم پلاسمید و ۱۰ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ ترانس فکت شدند.

\* یافته‌ها: نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی ثابت کرد که قطعه تکثیر و کلون شده همان cDNA PEP می‌باشد. این cDNA ۶۳۰ جفت‌بازی کدکننده ۲۰۹ اسید آمینه است که بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان دهنده وجود یک دامنه فیبرونکتین نوع ۳ از اسید آمینه ۳۱ تا ۱۱۴ و با احتمال بسیار زیاد دو دامنه آلفا هلیکس درون غشایی آب‌گریز از اسید آمینه ۱۲ تا ۳۲ و ۱۵۲ تا ۱۶۹ در آن می‌باشد. نتایج ترانس فکشن سلولی به همراه رنگ‌آمیزی اختصاصی کاتالاز ثابت می‌کند که این پروتئین با سیگنال انتهای کربوکسیل خود، (Serine Lysine Lucine; SKL)، به درون اندامک پراکسیزوم منتقل می‌شود.

\* نتیجه‌گیری: مطالعات اثبات می‌کند که PEP یک پروتئین پراکسیزومی است؛ هرچند این پروتئین یک دامنه فیبرونکتین نوع ۳ و دو دامنه آب‌گریز دارد که نقش آنها هنوز نامشخص است.

\* کلیدواژگان: فیبرونکتین، پراکسیزوم، سیگنال PTS1

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۹۶-۲۰۳

## مقدمه

می‌باشند که در آنها جهش‌های مختلف در ژن‌های مسئول بیوژنز پراکسیزوم (PEX) صورت گرفته است (۱۰-۶). از آنجا که پراکسیزوم فاقد هرگونه ماده ژنتیکی است، پروتئین‌های پراکسیزومی توسط ژن‌های هسته‌ای کد و بر روی پلی‌ریبوزوم‌های آزاد سیتوزول ترجمه شده و پس از آن به داخل پراکسیزوم‌هایی که از قبل در سیتوزول وجود داشته‌اند، منتقل می‌گردند (۶، ۹). انتقال اکثر پروتئین‌های پراکسیزومی به ماتریکس پراکسیزوم از طریق سیگنال هدف‌یاب پراکسیزومی نوع یک (Peroxisomal Targeting Signal Type I; PTS1) شامل سه اسید آمینه سرین، لیزین و لوسین (Serine Lysine Lucine; SKL) یا اسیدهای آمینه مشابه آنها در انتهای کربوکسیل پروتئین‌ها صورت می‌گیرد (۱۴-۱۱). گروهی از پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی نیز برای ورود به پراکسیزوم واجد توالی ۹ اسید آمینه‌ای قابل شکست در

پراکسیزوم‌ها اندامک‌های تک‌غشایی کروی شکل داخل سلولی هستند که به قطر یک الی یک دهم میکرومتر می‌باشند و در تمام سلول‌های یوکاریوتی، از مخمر تا انسان، وجود دارند (۱). اگر چه واکنش‌های سم‌زدایی و دفاع در مقابل استرس‌های اکسیداتیو از مهم‌ترین اعمال شناخته شده پراکسیزوم‌ها می‌باشد اما در این ارگانل با وجود آنزیم‌های مختلف، واکنش‌های متابولیک متنوعی از جمله بتا اکسیداسیون بسیاری از اسیدهای چرب بلند زنجیر و بیوسنتز پلاسمالوژن‌ها نیز انجام می‌شود (۵-۲). اهمیت نقش عملکردی پراکسیزوم‌ها در بیماری‌های ژنتیکی از قبیل سندروم زلوگر مشخص می‌گردد (۲، ۳).

بیماری‌های بیوژنز پراکسیزومی گروهی از بیماری‌های ژنتیکی

با برنامه دنا تورا سیون اولیه ۴ دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ سیکل به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام مرحله پایانی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (دستگاه Thermal cycler Eppendorf). هم‌زمان واکنش PCR برای ژن  $\beta$ -Tubulin 5 با پرایمرهای اختصاصی  $\beta$  Tubulin F و  $\beta$  Tubulin R (جدول ۱) به منظور تایید صحت سنتز cDNA انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

#### هضم آنزیمی

برای تایید قطعه cDNA PEP تکثیر یافته به عنوان محصول نهایی واکنش RT-PCR، از آنزیم *Pvu II* (Fermentas) استفاده شد.

#### ساخت پلاسمید بیانی حامل EGFP-PEP

محصول PCR مربوط به cDNA PEP که در واکنش PCR به واسطه پرایمرهای *pep-R Sal I* و *pep-F Bgl II* در ابتدا و انتهای خود به ترتیب حامل جایگاه‌های برش دو آنزیم *Bgl II* و *Sal I* گردیده بود، توسط آنزیم‌های *Bgl II* (Fermentas) و *Sal I* (TaKaRa) برش یافته و پس از تخلیص در پلاسمید بیانی pEGFP-C1 (Clontech) در جایگاه آنزیم‌های مذکور قرار گرفت. عمل اتصال قطعه تکثیر یافته به پلاسمید بیانی با کیت Ligation (Clontech) شرکت TaKaRa طبق پروتکل کیت انجام شد. باکتری‌های *One Shot TOP 10 Chemically competent* (Invitrogen) *E. Coli* به روش شوک حرارتی با پلاسمید حاصله ترانسفورم گردیدند.

از بین کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت 2YT حاوی کانامایسین ۳۰ میکروگرم در هر میلی لیتر (GIBCO)، کلونی‌های حاوی پلاسمید با استفاده از واکنش PCR با پرایمرهای *pep-R Sal I* و *pep-F Bgl II* انتخاب شدند.

#### تعیین توالی DNA

دو کلونی حاوی cDNA PEP برای تعیین توالی با استفاده از ۴ پرایمر *pep-R Sal I*، *pep-R Sal I*، *EGFP-C1 F*، *EGFP-C1 R*، *pep-F Bgl II*، *pep-F Bgl II* به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

انتهای آمینی پروتئین به نام سیگنال هدف یاب پراکسیزومی نوع دوم (PTS2) می‌باشند (۳، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۵).

پروتئین پراکسیزومی (Peroxisomal Protein; PEP) یکی از پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی است که در سال ۲۰۰۲ توسط فرماریتز و همکارانش توالی آن شناسایی و کلون گردید (۱۶). از مجموع مقالات محدود قبلی به نظر می‌رسد که این پروتئین در طی رشد و تکامل جنین نقش مهمی داشته باشد (۱۶). لذا جهت مطالعات زمینه‌ای در سلول‌های بنیادی، بر آن شدیم که cDNA مربوط به این ژن را مستقیماً در وکتور بیانی pEGFP-C1 پایین دست ژن EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) کلون و سپس در سلول CHO (Chinese Hamster Ovary) ترانسفکت نماییم. پلاسمید EGFP-C1 دارای ژن کدکننده پروتئین سبز فلورسانس است که به راحتی می‌توان به واسطه آن محصول ژن کلون شده را شناسایی نمود. در نهایت بیان ژن PEP و جای‌گیری آن در پراکسیزوم به کمک بیان پروتئین نو ترکیب حاوی EGFP قرار گرفته در بالا دست این ژن و ایمونوسیتوشیمی برای آنزیم پراکسیزومی کاتالاز بررسی شد.

#### مواد و روش‌ها

##### مدل حیوانی و استخراج RNA

پس از جداسازی بافت قلب از یک موش نژاد سوری، بافت قطعه قطعه گردید و با سرم فیزیولوژی سرد شست‌و شو داده شد. به قطعات بافتی یک میلی‌لیتر از محلول RNX-PLUS (سیناژن، ایران) اضافه و کل RNA سلولی به وسیله کیت مذکور استخراج شد. غلظت RNA تخلیص شده با دستگاه اسپکتروفوتومتری ارزیابی و RNA تخلیص شده با الکتروفورز افقی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

##### سنتز cDNA و RT-PCR

۲ میکروگرم RNA استخراج شده جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی با آنزیم DNase I (Fermentas) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار و از آن برای سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Fermentas) و الیگومرهای (Fermentas) dT به عنوان پرایمر استفاده شد. پس از آن واکنش PCR با دو میکرولیتر از cDNA سنتز شده، ۵ پیکومولار پرایمرهای *pep-R* و *pep-F Bgl II* *Sal I* (جدول ۱) و ۱/۲۵ واحد آنزیمی آنزیم *Pfu* (Fermentas)

جدول ۱: قسمتی که با زیر خط مشخص شده است منطبق با توالی cDNA PEP می‌باشد.

نام پرایمر	توالی پرایمر	حروف ضخیم
pep-F Bgl II	5'-ATT AGA TCT CCC CCA GGG CCG TGC GCC-3'	AGG TCT CCC CCA GGG CCG TGC GCC
pep-R Sal I	5'-AAA AGT CGA CTC ATA TCT TGC TGC GGA GGA GA-3'	AAA AGT CGA CTC ATA TCT TGC TGC GGA GGA GA
EGFP-C1 F	5'-AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG G-3'	AAC GAG AAG CGC GAT CAC ATG G
EGFP-C1 R	5'-GCA ATA AAC AAG TTA ACA ACA AC-3'	GCA ATA AAC AAG TTA ACA ACA AC
$\beta$ tubulin F	5'-TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC-3'	TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC
$\beta$ tubulin R	5'-GGA ACA TAG CCG TAA ACT G C-3'	GGA ACA TAG CCG TAA ACT G C

## طراحی پرایمر

طراحی پرایمر با توجه به توالی‌های (cDNA PEP) Clontech, catalog) EGFP-C1 (NM\_027402)، پلاسمید (β-tubulin5) و (GenBank Accession #: U55763) (#6084-1) Oligo 6.2 (NM\_0116550) با استفاده از نرم‌افزار (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1\_html/oligos.htm) انجام شد. پرایمرهای سنتز شده از شرکت Bioneer با واسطه شرکت تکاپوزیست خریداری شد. برای آنالیز توالی اسیدهای آمینه پروتئین PEP از نرم‌افزار Bio Edit Version 7.0.4 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.htm) و برای بررسی بیشتر ساختار پروتئینی و آنالیز بیوانفورماتیکی آن از نرم‌افزارهای TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/) و SMART (http://smart.embl-heidel-) (TMPRED\_from.html) استفاده شد. (berg.de/)

رطوبت و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت داده شد. پس از آن محیط ترانس فکت حذف و محیط کشت معمول سلول CHO به هرخانه اضافه و سلول‌ها برای ادامه کشت به انکوباتور منتقل گردید. ۴۸ ساعت پس از ترانس فکت، به منظور بررسی بیان ژن پراکسیزومی EGFP-PEP در سلول‌های ترانس فکت شده، این سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد (Sigma) فیکس و جهت ردیابی مارکر پراکسیزومی کاتالاز در سلول‌های مذکور، ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی اختصاصی (Rabbit Anti Cata (abcam 1:300) و Donkey Anti lase و آنتی‌بادی ثانویه (Amersham 1:400) و Rabbit Texas Red انجام شد. نتایج با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت Olympus BX5 مشاهده شد. این طرح مصوبه کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان است.

## یافته‌ها

## جدا نمودن RNA کلی سلول و RT-PCR

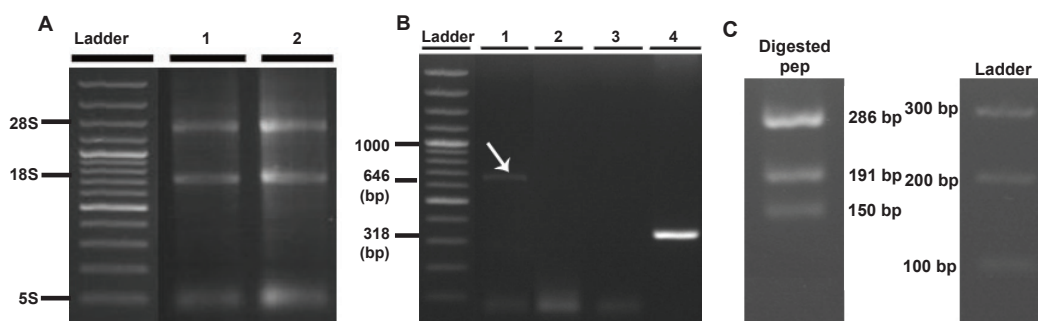
شکل ۱A، RNA استخراج شده از بافت قلب را نشان می‌دهد. در هر دو نمونه استخراج شده باندهای 28S, 18S and 5S ribosomal RNA به وضوح دیده می‌شود و عدم وجود باندهای دیگر نشان دهنده کیفیت بالای RNA تخلیص شده می‌باشد. ضمناً وجود نشانگر DNA در ژل در کنار RNA تنها به منظور نشان دادن کیفیت بالای ژل مورد استفاده قرار گرفته شده است و جنبه مقایسه‌ای ندارد.

در شکل ۱B، باند ۶۳۰ جفت بازی در ستون ۱ احتمالاً بیان کننده تکثیر cDNA PEP با الگوی cDNA سنتز شده از RNA بافتی می‌باشد. در این واکنش از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل منفی (ستون ۲) و از نمونه‌ای که در مرحله سنتز cDNA به آن آنزیم Reverse Transcriptase اضافه نشده بود به عنوان RT منفی استفاده شد (ستون ۳). عدم وجود باند پس از PCR در این دو نمونه به ترتیب بیانگر عدم آلودگی و عدم تکثیر احتمالی PEP از روی DNA ژنومی می‌باشد. باند ۳۱۸ جفت باز در ستون ۴ شکل ۱B، مربوط به PCR قطعه‌ای از cDNA β-tubulin 5 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بتائوبولین است که نشان دهنده صحت و کیفیت مراحل کار می‌باشد.

شکل ۱C، نتیجه برش محصول PCR مربوط به cDNA PEP با آنزیم Pvu II را نشان می‌دهد. قطعات ۱۹۱ و ۲۸۶ و ۱۵۰ جفت باز ایجاد شده دقیقاً مطابق قطعات مورد انتظار حاصل از شکست دو جایگاه برش آنزیم Pvu II در cDNA PEP می‌باشد.

## کشت سلولی و و ترانس فکت شدن سلول‌ها

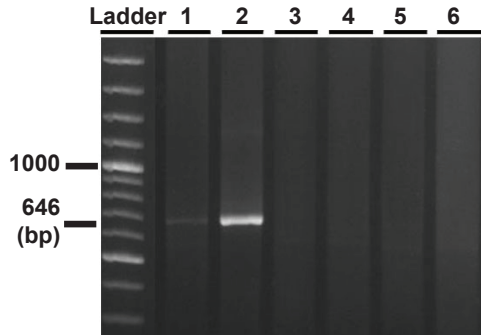
رده سلولی CHO از پژوهشگاه رویان تهران تهیه گردید. سلول‌های CHO در محیط کشت (Sigma) Ham'sF12 حاوی ۱۰ درصد FCS (Gibco) در انکوباتور با ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد. پس از مفروش شدن کف فلاسک، سلول‌ها به کمک (Try/EDTA (Gib) CO تریپسینه و پس از شمارش سلولی، تعداد ۹×۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر خانه دیش‌های ۶ خانه که از قبل لامل گذاری (لامل ۲۴×۲۴ میلی‌متر) شده بودند، کشت داده شد. پس از اینکه سلول‌ها ۶۰-۵۰ درصد کف دیش را پر کردند، ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر محلول Opti-MEM حاوی ۴ میکروگرم پلاسمید EGFP-PEP (محلول پلاسمید) و ۲۵۰ میکرولیتر محلول Opti-MEM حاوی ۱۰ میکرولیتر Lipofectamine 2000 (Invitrogen) (محلول لیپوفکتامین) تهیه شد. پس از انکوباسیون دو محلول در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، این دو محلول با یکدیگر مخلوط (محلول ترانس فکت) و محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق انکوبه شد. سپس محیط کشت سلول‌ها حذف گردید و سلول‌ها به آرامی با محیط کشت Opti-MEM I (Gibco) فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک شست‌شو داده شد. در نهایت محلول ترانس فکت همراه با ۲ میلی‌لیتر محیط Opti-MEM I به هر خانه اضافه شد. سلول‌ها با این محیط به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد



شکل ۱: A. استخراج RNA از بافت قلب، نتایج استخراج RNA از بافت قلب موش. مارکر ۱۰۰ جفت باز فرمنتاز، ۱. نمونه شماره ۱ و ۲. نمونه شماره ۲. B. محصولات PCR، مارکر ۱۰۰ جفت باز فرمنتاز، ۱. تکثیر cDNA با پرایمرهای اختصاصی PEP، ۲. نمونه RT، ۳. نمونه کنترل منفی، ۴. تکثیر cDNA با پرایمرهای اختصاصی بتائوبولین. C. نتیجه هضم آنزیمی محصول تکثیر cDNA PEP با آنزیم Pvu II

## کلونینگ PEP cDNA موش

دارد. تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب با پرایمرهای EGFP-C1 F و EGFP-C1 R نشان داد که PEP cDNA در وکتور EGFP-C1 به صورت هم خوانش با ژن EGFP قرار گرفته است.

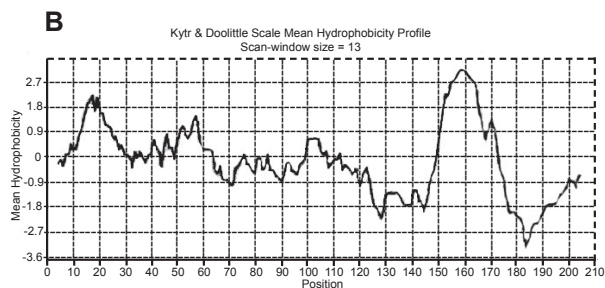
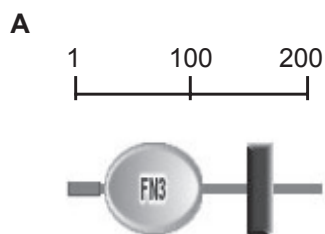


شکل ۲: نتایج بررسی وجود PEP cDNA در کلونی‌های حاصل از ترانس فورم باکتریایی با استفاده از PCR. همانطور که ملاحظه می‌شود ستون‌های ۳ تا ۶ کلونی‌های فاقد PEP cDNA و ستون‌های ۱ و ۲ دو کلونی حاوی PEP cDNA می‌باشند.

```

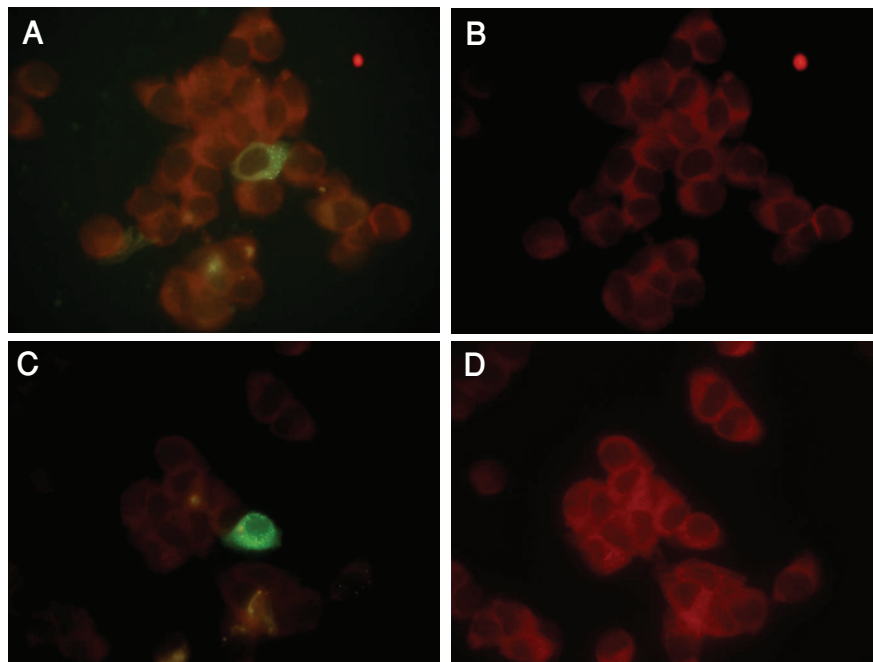
ATGCCCCAGGGCCGTGCGCCTGGCCGCCCGCCCGCCGCTCCGCTGGGCTAGGCTGCGTCTGCTTCGCGCTG
M P P G P C A W P P R A A L R L W L G C V C F A L
GTGCAGGCGGACAGCCCTCAGCCCTGTGAACGTGACCGTCCGGCACCTCAAGGCCAACTCTGCCGTGGTCAAG
V Q A D S P S A P V N V T V R H L K A N S A V V S
TGGGATGCTCCTGGAGGATGAAGTGGTTCATTGGCTTTGCCATCTCTCAGCAGAAGAAGGATGTGCGGATGCTCCGG
W D V L E D E V V I G F A I S Q Q K K D V R M L R
TTCATTGAGGAGTGAACACCACCACCCGGTCTCCTGCGCTCTCTGGGACCTGGAGGAGACACAGAATATATCGTC
F I Q E V N T T T R S C A L W D L E E D T E Y I V
CATGTGCAGGCCATCTCCATCCAGGGACAGAGCCAGCCAGTGAAGCCTGTGCTCTTCAAGACCCACCGGAGGCT
H V Q A I S I Q G Q S P A S E P V L F K T P R E A
GAAAAGATGGCCTCAAGAACAAGATGAGGTGACCATGAAGGAGATGGGGAGGAACCCAGCAGCTCGCAACGGGG
E K M A S K N K D E V T M K E M G R N Q Q L R T G
GAGGTGCTGATCATTGTGTGGTCTCTTTCATGTGGGAGGTGTATAGCTCTCTTCTGCCCGCAGTATGATATC
E V L I I V V V L F M W A G V I A L F C R Q Y D I
ATCAAGGACAACGAGCCCAATAACAACAAGGAGAAAACAAGAGCGCATCAGAAACCAGCACACCGGAGCATCAG
I K D N E P N N N K E K T K S A S E T S T P E H Q
GGTGGGGTCTCCTCCGCGCAGCAGATATGA
G G G L L R S K I *
    
```

شکل ۳: توالی PEP cDNA، توالی نوکلئوتیدی که با زیرخط مشخص شده است جایگاه‌های شکست توسط آنزیم Pvu II می‌باشد. قسمت پر رنگ شده انتهای توالی SKI است. توالی اسید آمینه‌های قرار گرفته در مستطیل مربوط به زنجیره‌های آب‌گریز است. توالی اسید آمینه‌هایی که با زیرخط پررنگ مشخص گردیده، دامنه فیبرونکتین نوع ۳ است.



شکل ۴: (A) آنالیز ترادف اسیدهای آمینه پروتئین PEP با برنامه SMART، همان‌طور که در شکل نشان داده شده است در ساختار این پروتئین یک سیگنال پپتید در ناحیه اسیدهای آمینه ۱ تا ۲۸، یک قطعه درون غشایی در ناحیه اسیدهای آمینه ۱۴۷ تا ۱۶۹ و یک دامنه فیبرونکتین نوع ۳ در ناحیه اسیدهای آمینه ۳۱ تا ۱۱۱ وجود دارد.

(B) بررسی میزان آب‌گریزی اسیدهای آمینه موجود در پروتئین PEP با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit، همان‌طور که در شکل نشان داده شده است در ساختمان این پروتئین دو زنجیره آب‌گریز از اسید آمینه‌های شماره ۱۵۲ تا ۱۶۹ و ۱۲ تا ۳۲ وجود دارد.



شکل ۵: تراش فکت سلول‌ها با پلاسمید EGFP-PEP و رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی پراکسیزومی کاتالاز. نقاط سبز رنگ پراکنده درون سلول‌ها، بیان پروتئین EGFP-PEP (A, B). نقاط قرمز رنگ پراکنده درون سلول‌ها رنگ‌آمیزی آنزیم کاتالاز با آنتی‌بادی اولیه اختصاصی کاتالاز و آنتی‌بادی ثانویه Texas Red را نشان می‌دهد (C, D). الگوی مکانی مشابه این دو رنگ بیانگر پراکسیزومی بودن PEP می‌باشد. بار برابر با ۲۰ میکرومول است.

در جمعیتی از سلول CHO بیانگر وارد شدن پلاسمید نو ترکیب به درون این سلول‌ها و بیان پلاسمید در سلول‌های مذکور می‌باشد (A, C). علاوه بر این تشابه الگوی پراکندگی فلورسنت مربوط به EGFP با کاتالاز پراکسیزومی (B, D)، بیانگر وارد شدن این پروتئین به درون پراکسیزوم‌ها می‌باشد.

### بحث

تاکنون استفاده از روش‌های ژنتیکی و پروتئومیکسی به شناسایی ۳۲ نوع پروتئین پراکسین که لازمه بیوژنز پراکسیزوم‌ها می‌باشد، منجر شده است. بعضی از پراکسین‌ها مسئول تقسیم شدن پراکسیزوم و تشکیل پراکسیزوم‌های جدیدتر از پراکسیزوم‌های قبلی می‌باشند اما بیشتر آنها در انتقال و هدایت پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی نقش دارند (۶، ۱۷). بسیاری از بیماری‌های پراکسیزومی به علت نقص در انتقال پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی به درون پراکسیزوم می‌باشند و هر چه تعداد پروتئین‌های واقع در این ارگانل بیشتر شناخته شود احتمالاً ارتباط بیشتری بین آنها و بیماری‌های انسانی با منشأ پراکسیزومی یافت می‌شود.

استراتژی کلونینگ با استفاده از وکتور بیانی یک روش مؤثر در درک فعالیت ژن‌های مختلف می‌باشد (۱۸). از آنجا که به نظر می‌رسد پروتئین PEP در طی رشد و تکامل جنین نقش مهمی داشته باشد (۱۶)، جهت مطالعات بیشتر در این زمینه بر آن شدیم که ابتدا cDNA این ژن را کلون نماییم. در این مطالعه cDNA PEP در وکتور بیانی pEGFP-C1 کلون و به دنبال بیان آن در سلول‌های پستانداران جنبه‌های مختلفی همچون محل قرارگیری درون ارگانلی این پروتئین مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی ساختار پروتئین PEP

برای بررسی ساختار احتمالی پروتئین PEP از برنامه‌های مختلف بیوانفورماتیکی استفاده شد. نتایج آنالیز PEP با برنامه TMpred نشان دهنده احتمال بالای وجود دوساختار آلفا هلیکس غشایی در دو ناحیه بین اسیدآمینه‌های ۱۲ تا ۳۱ و ۱۵۲ تا ۱۷۰ می‌باشد. هم‌چنین به منظور تایید نتایج حاصل از مطالعه بالا از برنامه دیگری به نام SMART که با آن می‌توان دامنه‌های مختلف پروتئین را شناسایی نمود، استفاده گردید. آنالیز ترادف اسیدهای آمینه پروتئین PEP با این برنامه نشان داد که در ساختار این پروتئین یک سیگنال پپتید در ناحیه اسیدهای آمینه ۱ تا ۲۸، یک قطعه درون غشایی در ناحیه اسیدهای آمینه ۱۴۷ تا ۱۶۹ و یک دامنه فیبرونکتین نوع ۳ در ناحیه اسیدهای آمینه ۳۱ تا ۱۱۱ وجود دارد (شکل ۴A). با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit میزان آب‌گریزی اسیدهای آمینه موجود در پروتئین PEP با روش Kyte and Doolittle با خوانش ۱۳ اسیدآمینه در هر پنجره انجام گرفت و مشخص گردید که در ساختمان این پروتئین دو زنجیره آب‌گریز از اسیدآمینه‌های شماره ۱۵۲ تا ۱۶۹ و ۱۲ تا ۳۲ وجود دارد (شکل ۴B).

### ردیابی پروتئین پراکسیزومی PEP

از آنجا که در انتهای کربوکسیل پروتئین PEP سیگنال نشانه مشابه PTS1 وجود دارد، انتظار می‌رود این پروتئین به پراکسیزوم‌ها وارد شود و با قرار گرفتن cDNA PEP به دنبال ژن EGFP در یک قالب خوانشی، بتوان آن را ردیابی کرد. همان طور که در شکل ۵ نشان داده شد، رنگ سبز فلورسنت EGFP

دیده می‌شود. این دو دامنه که به احتمال زیاد دارای ساختار آلفا هلیکس می‌باشند، بیانگر وجود دامنه‌های درون غشایی فرضی در داخل این پروتئین است. در نتیجه می‌باید مطالعات بیشتری بر روی غشایی بودن پروتئین PEP صورت بگیرد. به علاوه این پروتئین در انتهای خود دارای پپتید SKI مشابه پپتید SKL - که مسئول هدایت پروتئین‌های ماتریکسی به داخل پراکسیزوم است - می‌باشد.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعات فریر مارتینز روی سلول‌های C2C12 و ۲۹۳ و Ala-T1 و HepG2 نشان داد که پروتئین PEP متصل شده به EGFP به درون پراکسیزوم وارد می‌گردد (۱۶). در مطالعه حاضر نیز جای‌گیری پروتئین PEP متصل به EGFP درون اندامک پراکسیزومی سلول CHO تایید گردید. البته مطالعات آینده با استفاده از حذف پپتید SKI و بررسی جای‌گیری درون سلولی پروتئین PEP فاقد SKI می‌تواند به صورت کاملی تایید کننده نقش این سیگنال هدایتی در انتقال پروتئین PEP به درون پراکسیزوم‌ها باشد.

### تقدیر و تشکر

بخش عمده هزینه‌های انجام این پروژه از طرح مصوب پژوهشکده رویان با عنوان "بررسی فاکتورهای ژنتیکی لازم برای پراکسیزوم در تمایز سلول‌های عصبی" به تاریخ ۸۵/۵/۱۰ و بخش دیگر از طرح مصوب دانشگاه اصفهان با عنوان "کلونینگ و ارزیابی عملکرد ساختار cDNA ژن پروتئین پراکسیزومی موش" به شماره ۸۵۱۰۱۷ به تاریخ ۸۵/۱۰/۱۷ تامین گردید.

### References

- Ferrer I, Kapfhammer J.P, Hindelang C, Kemp S, Troffer-Charlier N, Broccoli V, et al. Inactivation of the peroxisomal ABCD2 transporter in the mouse leads to late-onset ataxia involving mitochondria, Golgi and endoplasmic reticulum damage. *Hum Mol Genet.* 2005; 14(23): 3565-3577.
- 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.
- 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.
- Shimizu N, Itoh R, Hirono Y, Otera H, Ghaedi K, Tateishi K, et al. The peroxin Pex14p: cDNA cloning by functional complementation on a Chinese hamster ovary cell mutant, characterization, and functional analysis. *J Biol Chem.* 1999; 274(18): 12593-12604.
- Singha I, Paintlia AS, Khana M, Stanislaus R, Paintlia MK, Haqa E, et al. Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res.* 2004; 1022(1-2): 1-11.
- Brown LA, Baker A. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med.* 2003; 7(4):388-400.

استخراج RNA برای کلونینگ cDNA PEP از بافت قلب موش صورت گرفت. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که در بافت قلب، بیان این ژن همانند بافت عضله اسکلتی و مغز از سایر بافت‌های دیگر بیشتر است (۱۶). به منظور بررسی تایید cDNA سنتز شده واکنش RT-PCR برای قطعه ای از ژن  $\beta$ -tubulin 5 به عنوان یک Housekeeping Gene بیان شده در تمام بافت‌ها انجام شد (۱۹). برش با آنزیم Pvu II و در نهایت تعیین توالی قطعه کلون شده ثابت نمود که cDNA کلون شده همان PEP cDNA می‌باشد. بررسی ترادف بازهای این cDNA نشان می‌دهد که Open Reading Frame (ORF) ژن PEP با ۶۳۰ جفت باز کدکننده ۲۰۹ اسید آمینه می‌باشد. مطالعات بیوانفورماتیک با نرم‌افزارهای مختلف نشان داد که پروتئین PEP دارای یک دامنه مشابه با فیبرونکتین نوع ۳ می‌باشد (از اسید آمینه ۳۱ تا ۱۱۴) که تاکنون در مورد نقش احتمالی این دامنه در پروتئین مورد نظر اطلاعاتی به دست نیامده است. پروتئین‌های واجد دامنه فیبرونکتین دارای فعالیت‌های مختلفی در سلول‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به نقش این پروتئین‌ها در اتصالات سلولی، گیرنده‌های غشایی و هم‌چنین در ساختمان اسکلت سلولی اشاره نمود (۲۳-۲۰). بنابراین حضور این دامنه در ساختمان پروتئین PEP نشان دهنده وجود برهم‌کنش احتمالی این پروتئین با دیگر پروتئین‌های ناشناخته می‌باشد. این ایده با توجه به نقش اسکلت سلولی در مورفوژنز پراکسیزوم و پراکندگی داخل سلولی این ارگانل تقویت می‌گردد (۲۴). لذا مطالعات بیشتر و بررسی نقش احتمالی پروتئین PEP در این مورد ضروری به نظر می‌رسد. مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که در ساختمان این پروتئین دو دامنه آب‌گریز (از اسیدهای آمینه شماره ۱۲ تا ۳۲ و ۱۵۹ تا ۱۶۹)

- Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y, Fujiki Y. The peroxin Pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(6): 2085-2102.
- Michelakakis HM, Zafeiriou DI, Moraitou MS, Gootjes J, Wanders RJ. PEX1 deficiency presenting as leber congenital amaurosis. *Pediatr Neurol.* 2004; 31(2): 146-149.
- Ofman1 R, Speijer D, Leen R, Wanders R JA. Proteomic analysis of mouse kidney peroxisomes: identification of RP2p as a peroxisomal nuxid hydrolase with acyl-coenzyme A diphosphatase activity. *Biochem J.* 2006; 393(2): 537-543.
- Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Ghaedi K, Fujiki Y, Kondo N. Identification of PEX3 as the gene mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. *Hum Mol Genet.* 2000; 19(13): 1995-1999.
- Baker A, Charlton W, Johnson B, Lopez-Huertas E, Oh J, Sparkes I, et al. Biochemical and molecular approaches to understanding protein import into peroxisomes. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(4):499-504.
- Baker A, Sparkes IA. Peroxisome protein import: some answers, more questions. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; 8(6): 640-647.
- Elgersma Y, Vos A, van den Berg M, Van Roermund C.W, 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(42): 26375-2682.

14. Kamigaki A, Mano S, Terauchi K, Nishi Y, Tachibe Kinoshita Y, Nito K, et al. Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor. *Plant J.* 2003; 33(1): 161-175.
  15. Mukai S, Ghaedi K, Fujiki Y. Intracellular localization, function, and dysfunction of the peroxisome-targeting signal type 2 receptor, Pex7p, in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2002; 277(11): 9548-9561.
  16. Ferrer-Martínez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR. Mouse PeP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Dev Dyn.* 2002; 224(2): 154-167.
  17. Heiland I, Erdmann R. Biogenesis of peroxisomes: topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J.* 2005; 272(10): 2362-2372.
  18. Nyborg AC, Ladd TB, Jansen K, Kukar T, Golde TE. Intramembrane proteolytic cleavage by human signal peptide peptidase like 3 and malaria signal peptide peptidase. *FASEB J.* 2006; 20(10): 1671-1679.
  19. Bagutti C, Wobus A.M, Fässler R, Watt F.M. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol.* 1996; 179(1): 184-96.
  20. Amodeo P, Fraternali F, Lesk AM, Pastore A. Modularity and homology: modelling of the titin type I modules and their interfaces. *J Mol Biol.* 2001; 311: 283-296.
  21. Huang H, Sylvan J, Jonas M, Barresi R, So PT, Campbell KP, Lee RT. Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 288(1): 72-80.
  22. Li L, Huang HH, Badilla CL, Fernandez JM. Mechanical unfolding intermediates observed by single-molecule force spectroscopy in a fibronectin type III module. *J Mol Biol.* 2005; 345(4):816-826.
  23. Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, Westphal H. Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes. *Gene.* 2002; 297(1-2): 79-83.
  24. Doniwa Y, Arimura S.I, Tsutsumi N. Mitochondria use actin filaments as rails for fast translocation in Arabidopsis and tobacco cells. *Plant Biotech.* 2007; 24: 441-447.
-