VC-1209

بیان mRNA گیرنده عملکردی لپتین در کبد گوسفند

عباس ابویسانی[۱]، حسام دهقانی[۲]، مرتضی زاهدی[۳]

[۱]استادیار و [۲]دانشیار بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. [۳]دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

خلاصه

لپتین یک هورمون پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶ کیلودالتون است که به طور عمده توسط بافت چربی سنتز می شود. با توجه به نقش لپتین در تنظیم اشتها، میزان بافت چربی و ترکیب بدن استفاده از آن در سرعت بخشیدن به میزان رشد و کاهش میزان چربی لاشه گوسفند مدنظر است. از آنجایی که رسیدن به هدف مطلوب مستلزم شناسایی بافت (های) هدف این هورمون و در حقیقت گیرنده (های) آن می باشد لذا در این مطالعه بیان رونوشت (mRNA) گیرنده عملکردی لپتین با روش رونوشت برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه بافت کبد در کشتارگاه تهیه و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج RNA در فریزر $^{\circ}C$ ۸۰- نگهداری گردید. سپس با استفاده از محلول TRipure، RNA نمونه استخراج شد و آلودگی احتمالی DNA با استفاده از آنزیم DNase-RNase free حذف گردید و به دنبال آن cDNA ساخته شد. با استفاده از cDNAهای به دست آمده و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده واکنش PCR انجام شد. الکتروفورز محصولات نهایی واکنش RT-PCR، نشانگر تکثیر قطعه مورد انتظار مربوط به cDNA گیرنده عملکردی لپتین (Ob-Rb) در بافت کبد گوسفند بود. ژن بتا اکتین نیز به عنوان کنترل مثبت داخلی مورد استفاده قرار گرفت و با توجه به اینکه پرایمر این ژن بر روی دو اگزون طراحی شده بود لذا تنها بیان قطعه مربوط به cDNA (و نه قطعه DNA) بیانگر هم درستی واکنش ها و هم تایید عدم آلودگی به DNA بود. لذا نتایج این مطالعه مشخص نمود بافت کبد که به عنوان یک اندام مهم دخیل در متابولیسم بدن می باشد یکی از بافت های هدف لپتین است و این نکته بایستی در مطالعات پایه ای و کاربردی مرتبط با لپتین در گوسفند مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گوسفند، رونوشت گیرنده عملکردی لپتین، کبد، RT-PCR.

مقدمه

لپتین پروتئینی با ۱۴۶ اسید آمینه و ۱۶ کیلو دالتون جرم مولکولی است که بطور عمده توسط بافت چربی سفید تولید می شود (Zhang et al. 1994). لپتین عمدتا" در بافت چربی سفید و از ۱۶۷ اسید آمینه ساخته شده و پس از جدا شدن ۲۱ اسیدآمینه در داخل میکروزوم ها با طول ۱۴۶ اسیدآمینه به داخل خون رها می شود. ارتباط مثبت بسیار قوی بین mRNA

لپتین و سطوح پروتئین لپتین در بافت چربی و مقادیر لپتین خون وجود دارد. از آنجائیکه لپتین در مقادیر قابل توجه ذخیره نمی شود به نظر می رسد که ترشح آن به طور پیوسته انجام می گیرد (Baratta 2002).

اثرات لپتین در سیستم های مختلف دربرگیرنده مسیرهایی است که اشتها، مصرف انرژی و ترشح هورمونهای تولیدمثلی و متابولیکی را تنظیم می کنند (Zeiba et al. 2005). تارتاگلیا (۱۹۹۷) برای اولین بار گیرنده لپتین (Ob-R) را از موش به عنوان محصول ژن دیابت (db) جدا کرد. گیرنده لپتین واجد ۶ ایزومر مختلف می باشد که عبارتند از: Ob-Ra, Ob/Rb, Ob/Rc, Ob/Rd, Ob/Re , Ob/Rf. تنها ایزوفرم Ob/Rb دارای بخش داخل سلولی طویل بوده و اجزاء لازم را جهت فعال ساختن سیگنال های داخل سلولی دارا می باشد، از این رو به عنوان ایزوفرم عملکردی[8] یا شکل بلند[9] شناخته می شود. مسیر JAK2/STAT مهمترین مکانیسم داخل سلولی لپتین می باشد. با این وجود، مسیرهای MAPK و PI-3K نیز در انتقال سیگنال دخیل می باشند (Zeiba 2005). لپتین به عنوان اندیکاتور ذخایر انرژی بوده و واسطه بالانس انرژی می باشد. لپتین با کاهش اشتها و افزایش تولید گرما از چاقی ممانعت می نماید. اما با توجه به این نکته که میزان لپتین در پاسخ به وعده های غذایی افزایش نمی یابد، بعید به نظر می رسد که به عنوان سیگنال سیری در کوتاه مدت عمل نماید (Ahima and Fleir 2000). نقش لپتین در تنظیم وزن بدن ممکن است با سیگنال های متابولیکی دیگر نظیر انسولین و گلوکوکورتیکوئید ها همراه باشد (Ahima and Fleir 2000; Baratta 2002).

با توجه به نقش های متنوعی که به لپتین نسبت داده می شود می توان اندام های هدف مختلفی برای آن تصور نمود. به عنوان مثال، mRNA گیرنده عملکردی لپتین در بافت های چربی، عضله اسکلتی، کبد، کلیه، بیضه، دئودنوم، هیپوتالاموس و هیپوفیز گاو ردیابی شده است (Chelikani et al. 2003). لذا با توجه به اهمیت هورمون لپتین در متابولیسم و از آنجائی که کبد به عنوان یک اندام موثر و مرکزی در متابولیسم بدن دخیل است لذا مطالعه اخیر با هدف بررسی وجود یا عدم وجود گیرنده عملکردی لپتین در کبد گوسفند انجام شد تا مشخص شود آیا کبد گوسفند به عنوان یکی از اندام های هدف هورمون لپتین می باشد.

مواد و روش کار

برای جمع آوری نمونه های بافتی، با مراجعه به کشتارگاه صنعتی مشهد بلافاصله پس از ذبح گوسفند نمونه کبد اخذ گردید. نمونه ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و پس از خرد نمودن حدود ۵۰ میلی گرم بافت به لوله های ۱/۵ میلی لیتری اپندورف منتقل گردید. نمونه ها در فریزر $-۸۰^{\circ}C$ تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از محلول TRizol (Roche) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در مرحله پایانی جداسازی RNA، پلت

[8] - Functional isoform
[9] - Long form

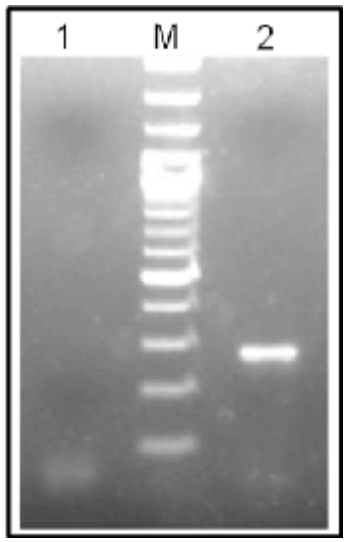
RNA با ۵۰ میکرولیتر آب RNase free آغشته به دی اتیل پیروکربنات گرم شده (۶۰-۵۵ درجه سانتیگراد) حل گردید. به منظور حذف DNA ژنومی، از آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز I (DNase I) عاری از RNase استفاده شد. در مرحله بعد، واکنش رونوشت برداری معکوس برای تهیه cDNA با استفاده از $Oligo(dT)_{18}$ و آنزیم رونوشت برداری معکوس (M-MULV) انجام گردید.

جفت پرایمرهای (Forward و Reverse) اختصاصی ژن های بتااکتین (ژن کنترل) و گیرنده لپتین بر اساس اطلاعات توالی موجود در بانک ژن طراحی شدند (NM_001009763 و NM_001009784). پرایمر های بتااکتین بر روی دو اگزون متفاوت طراحی گردیدند تا باند حاصل از تکثیر DNA و cDNA متفاوت از یکدیگر باشد. در این صورت امکان آلودگی نمونه های cDNA با DNA ژنومی قابل تشخیص بود. نتایج حاصل از تکثیر cDNA بتااکتین قطعه ۲۷۷ جفت بازی، و قطعه حاصل از تکثیر DNA بتااکتین ۳۶۶ جفت بازی بود. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاد از پرایمرهای طراحی شده و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در طی ۴۰ سیکل و با شرایط دمایی مناسب (۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشت، ۴۵ ثانیه با دمای ۶۶ درجه سانتی گراد برای بتااکتین و ۵۵/۵ درجه سانتی گراد برای گیرنده لپتین جهت اتصال آغازگر به قسمت مکمل در الگو، ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طویل شدن آغازگرها و در پایان ۱۰ دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت طویل شدن رشته های جدید) در دستگاه ترموسیکلر انجام شد.

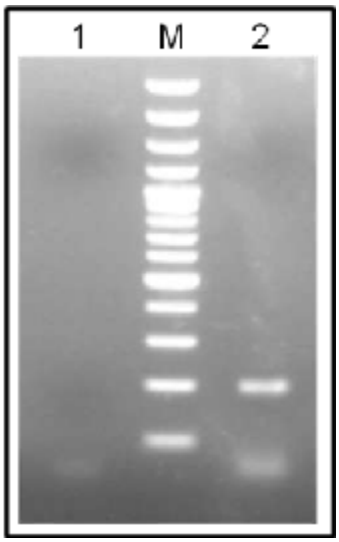
محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ در صد با استفاده از تانک الکتروفورز تفکیک شده و با استفاده از دوربین در زیر اشعه فراء بنفش قابل رویت گردیدند. باندهای بدست آمده با باند مارکر استفاده شده در ژل الکتروفورز مقایسه شد تا اندازه باندها مشخص شود.

نتایج و بحث

با استفاده از mRNA بتااکتین، به عنوان یک Housekeeping gene (ژنی که همیشه فعال بوده و در شرایط مختلف به یک میزان بیان می شود)، وضعیت کمی و کیفی RNAهای استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از مشخص شدن وضعیت مطلوب کیفی و کمی RNA، واکنش PCR RT-PCR با استفاده از پرایمرهای مخصوص گیرنده لپتین انجام شد.



شکل ۱- الکتروفورز قطعه حاصل از تکثیر cDNA با اکتین (۲۷۷ جفت بازی) بافت کبد. کبد : مارکر ۱۰۰ M(خط۲)، کنترل منفی (خط ۲). DNAجفت بازی.



شکل۲- بیان mRNA گیرنده عملکردی لپتین استخراج شده از بافت کبد با RNA از . الکتروفورز RT-PCR استفاده از واکنش گیرنده لپتین (۱۹۷ جفت cDNA قطعه بازی) تکثیر شده از بافت کبد (خط۲). : مارکر ۱۰۰ جفت Mکنترل منفی (خط۱). . DNA بازی

اگرچه جهت حذف آلودگی ژنومی در نمونه های RNA استخراج شده از آنزیم DNase I استفاده می شد، لیکن به منظور اطمینان بیشتر پرایمر بتا اکتین بر روی دو اگزون متفاوت طراحی گردید تا تکثیر از روی DNA نسبت به cDNA قطعه بزرگتری را تولید نماید (داده ها نشان داده نشده). انجام واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای بتا اکتین و cDNA سنتز شده از نمونه منجر به پدیدار شدن قطعه ۲۷۷ جفت بازی گردید (شکل ۱). این یافته به همراه عدم تکثیر قطعه ۳۶۶ جفت بازی، نشانگر نبود آلودگی ژنومی در نمونه های RNA و همچنین کیفیت و کمیت مناسب RNA برای انجام مرحله بعد یعنی ردیابی mRNA گیرنده لپتین بود.

در مرحله بعد واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی گیرنده لپتین انجام شد و آنالیز محصولات تکثیر شده بیان mRNA آن در کبد گوسفند را هماهنگ با مطالعه انجام شده در گاو (Chelikani et al. 2003) تایید کرد

(شکل۲). حال با توجه به بیان گیرنده لپتین در بافت کبد گوسفند، بایستی نقش های پاراکرینی/اتوکرینی آن در فیزیولوژی کبد گوسفند و اثرات متابولیسمی آن (Ahima and Fleir 2000) درتحقیقات آتی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

1. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Freidman, J. M., (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature Vol. 372: 425- 432.
2. Zeiba, D. A., Amstalden, M., Williams, G. L., (2005). Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. Dom. Ani. Endocrinol. 29: 166-185.
3. Baratta, T., Sayed-Ahmeda, A., Rudas, P., (2005). Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. Dom. Ani. Endocrinol. 29: 193-202.
4. Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. J Biol. Chem. 272(10): 6093-6096.
5. Chelikani, P. K., Glimm, D. R., Kennelly, J. J., (2003). Short communication: Tissues distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. J. Dairy Sci. 86: 2369-2372.
6. Ahima, R. S., Fleir, J. S., (2000). Leptin. Annu. rev. physiol. 62: 413-437.