ژنهای تنظیم کننده مرگ برنامه ریزی شده سلولی در یومتازوآی ابتدایی

مینا معتمدی

کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

چکیده

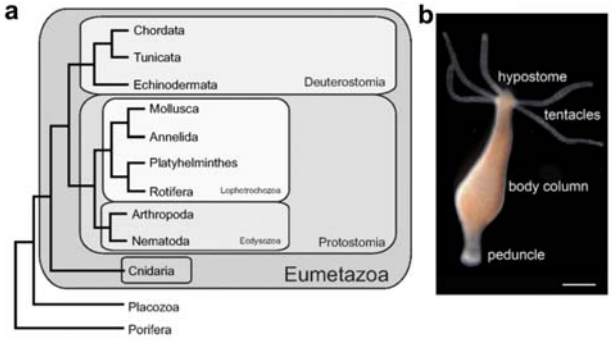
در این تحقیق برای اولین بار به شناسایی، استخراج و بررسی بیان ژنهای محافظ سلولی (لایف‌گارد) در هیدر آب شیرین *Hydra vulgaris* پرداخته شده است. بدین منظور،۱۰۰ عدد از پولیپهای هیدر آب شیرین پرورش یافته برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند و جهت تکثیر ژنهای مورد نظر پرایمرهای خاص طراحی و واکنش PCR صورت گرفت. پس از تکثیر ژنهای لایف‌گارد، به منظور بررسی محل بیان این ژنها، از تکنیک هیبریداسیون درجا با استفاده از دیگوکسیژنین استفاده شد. نتایج نشان داد که سه توالی از پروتئین لایف‌گارد به نامهای لایف‌گارد-۴ و دو هومولوگ از لایف‌گارد-۱ بی‌مهرگان در هیدر وجود دارد. هیبریداسیون درجا مشخص کرد که پروتئین لایف‌گارد-۴ در لایه اندودرم پولیپ در مراحل مختلف جوانه زدن مشاهده می شود. همچنین این پروتئین در زمان تولیدمثل غیرجنسی و مراحل مختلف تخمک‌زایی در تخمدان پولیپ ماده بیان می‌گردد. درخت فیلوژنی مشخص نمود که ژنهای لایف‌گارد در ساده‌ترین جانور حقیقی به صورت تثبیت شده وجود دارد و از آنجایی که مکانیسم آپوپتوسیز در گامت زایی هیدر (تولید تخمک و اسپرم) نقش دارد، بیان ژن لایف‌گارد-۴ به عنوان ژن محافظ سلول در محلهایی که مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نقش ایفاء می کند، منطقی به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوسیز، پروتئین لایف‌گارد، هیبریداسیون درجا، یومتازوآ

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۷۵ ، پست الکترونیکی: m.motamedi@uk.ac.ir

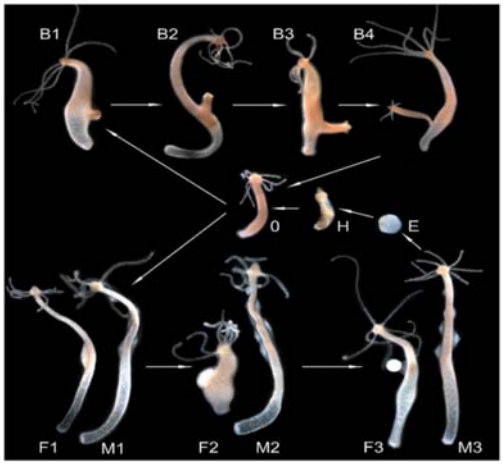
مقدمه

اعضای شاخه مرجانیان (Cnidarian) به عنوان ساده‌ترین گروه جانوران محسوب می‌گردند و در درخت تکاملی در پایه جانوران حقیقی (Eumetazoa) قرار می‌گیرند (شکل ۱a). ساختار بدنی هیدر آب شیرین به عنوان مدل معروف این گروه در شکل ۱bنشان داده شده است، ساختار بدنی آنها از دو لایه سلولی اکتودرم و اندودرم تشکیل شده است و توسط پایه (pedancle) به سطوح مختلف متصل می شود و از طریق بازوهای(tentacles) اطراف دهان (hypostome) طعمه را وارد حفره بدنی می کند (۷).



شکل ۱- (a) محل قرارگیری مرجانیان (Cnidaria) در درخت فیلوژنی (۲) و (b) طرح بدن پولیپ آب شیرین (۱). مقیاس ۱۰۰ میکرومتر.

هیدر آب شیرین به دو روش جوانه زدن (تولید مثل غیرجنسی) و تولید اسپرم و تخمک (تولید مثل جنسی) تکثیر پیدا می کند. در روش جوانه زدن که در زمان فراوانی مواد غذایی در دسترس صورت می گیرد، چهار مرحله بارز وجود دارد که این مراحل از زمان شروع جوانه تا زمانی که هیدر جدید قادر به زندگی مستقل می باشد، تقسیم بندی می شود (شکل ۲)، (۳).



شکل ۲- تولید مثل در پولیپ آب شیرین. مراحل B۱-B۴ نشان دهنده چهار مرحله مختلف جوانه زدن هیدر (تولید مثل غیر جنسی) است. داده شده است. مراحلF۱-F۳ برای جنس ماده و مراحل M۱-M۳ برای جنس نر نشان دهنده تکوین بیضه ها و تخمدان در پولیپ نر و ماده در زمان تولید مثل جنسی می باشد. (E) نشان دهنده تخمک لقاح یافته می باشد که در زمان مساعد شدن محیط شکفته شده (H) و به صورت پولیپ بالغ (O) در می آید (۱).

اعضای این شاخه از جمله، هیدر آب شیرین به دلیل داشتن ویژگیهای منحصر به فرد، به عنوان مدل بسیار مناسبی برای انجام مطالعات سلولی تکوینی محسوب می-گردند. از جمله این ویژگیها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود؛ علاوه بر ساختار بدنی ساده و قابلیت تکثیر سریع در محیط آزمایشگاهی، گونه هیدر آب شیرین همانند دیگر گونه های پیشرفته‌تر جانوری، واجد تمامی ژنها و پروتئینهای مرتبط با مکانیسم آپوپتوسیز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی) می‌باشد (۱۰). همچنین، مشخص شده است که فاگوسیتوز در سلولهای اپیتلیال هیدر صورت می‌گیرد و این عمل در پاسخ به تفاوت در میزان غذای در دسترس، ترمیم، گامت‌زایی و پایداری هوموستازی سلول انجام می شود (۲ و ۳). سلولهای جنسی در هیدر آب شیرین، از سلولهای بنیادی چندتوان ایجاد می‌شوند و تحریک پولیپها در هر دو جنس نر و ماده از طریق قحطی غذا و کاهش دمای محیط است (۲). با رنگ‌آمیزی توسط Acridine orange مشخص شده است که سلولهای زیادی در بیضه هیدر آب شیرین دارای واکوئل فاگوسیتوزی هستند (۹). علاوه بر این، از طریق آزمایش TUNEL که نشان دهنده فعالیت کاسپازها است، مشخص شده است که در سلولهای بیضه هیدر، مکانیسم آپوپتوسیز نیز در حال انجام است (۹). مکانیسم آپوپتوسیز در تخمک زایی پولیپ ماده نیز نقش دارد و در زمان تکوین تخمک، کلیه سلولهای پرستار وارد مسیر آپوپتوسیز می شود و در نهایت توسط تخمک فاگوسیتوز می شود (۱۱). در واقع سلولهای پرستار از طریق کانالهای ویژه‌ایی، سیتوپلاسم خودشان را در اختیار تخمک در حال رشد گذاشته و از این طریق مواد مورد نیاز برای تکوین تخمک را در اختیار آن قرار می-دهند (۱). مطالعات بیشتر مشخص نمود که مسیر سیگنالی آپوپتوسیز در هیدر بدون تغییر است و دارای شباهتهای بسیاری با جانوران پیشرفته‌تر از جمله پستانداران می‌باشد (۱۰). مطالعات قبلی انجام شده بر روی مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نشان داد که علاوه بر وجود ژنهای Bcl-2 و کاسپازها در هیدر، پروتئینهای این ژنها نیز از لحاظ عملکردی نیز کاملاً فعال هستند (۱۰). ژنهای مرتبط با تنظیم مکانیسم آپوپتوسیز که نقش حفاظت سلولی دارند نیز در این گونه به صورت کاملاً حفاظت شده وجود دارد. به طور کلی این پروتئینها تحت عنوان خانواده TMBIM (The transmembrane Bax inhibitor-1 motif containing) شناخته می‌شوند (۶و۸). تعداد ۵ ژن متعلق به این خانواده در پستانداران وجود دارد که شامل GRINA، BI-1/TMBIM6، Lfg/FAIM2، GHITM، RECS1/TMBIM1، GAAP/TMBIM4 و TMBIM1b

می‌باشد (۸ و ۱۲). اعضای این خانواده در دو گروه اصلی لایف‌گارد (Lifequard) و مهارکننده پروتئین Bax (BI-1/ Bax inhibitor) طبقه‌بندی می‌شوند (۸). گروه پروتئینی لایف گارد شامل اعضای GRINA/Lfg-1، FAIM2/Lfg-2، RECS1/Lfg-3، GAAP/Lfg-4 و TMBIM1b/Lfg-5 می‌باشند و گروه پروتئینی مهارکننده Bax (BI-1) در شاخه مجزایی از درخت فیلوژنی قرار می‌گیرد (۸). وجه تشابه این گروهها علاوه بر ساختار و محل استقرار در نقش تنظیم کنندگی، در مکانیسم آپوپتوسیز می باشد و به گونه‌ایی عمل می‌کنند که مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شده و از این طریق تعادل را در این مکانیسم ایجاد می‌کنند. در رابطه با مکانیسمهای عملکردی این پروتئینها در مهار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، پروتئین BI-1 در پستانداران بر مهار آپوپتوسیز فعال شده از مسیر داخلی pathway apoptosis intrinsic نقش بسزایی دارد (۳). از میان پروتئینهای لایف‌گارد، لایف‌گارد-۴ که محل استقرار آن دستگاه گلژی است، بیشتر مورد بررسی قرار گرفته و از این رو با نام (Golgi anti-apoptotic protein (GAAP)) نیز شناخته می شود (۱۱). لایف‌گارد-۴ در مهار آپوپتوسیز نیز نقش دارد اما مکانیسمهای دقیق آن هنوز کشف نشده است (۵). علاوه بر این، لایف‌گارد-۴ از لحاظ تکاملی زودتر از اعضای دیگر این گروه جدا شده و دیگر اعضای لایف گارد از یک جد مشترک مستقل اشتقاق یافته‌اند (۱۰). همچنین لایف‌گارد-۱ در بی‌مهرگان گروه مجزایی را تشکیل می‌دهد و از این رو تحت عنوان ((Lfg-i lifeguard invertebrates) نام گذاری شده است (۱۰).

با توجه به اینکه مکانیسم آپوپتوسیز در هیدر آب شیرین بسیار ثابت و بدون تغییر است و علاوه بر وجود تمامی پروتئینهای مؤثر در این مکانیسم، نقش عملکردی آنها نیز اثبات شده است، بنابراین، در این مطالعه برای اولین بار به شناسایی، استخراج و بررسی الگوی بیان ژنهای لایف‌گارد (که نقش تنظیم‌کنندگی مکانیسم آپوپتوسیز را دارند) در ابتدایی‌ترین جانوران (هیدر آب شیرین) پرداخته شد تا از این طریق به بررسی دقیق‌تر این مسیر مؤثر در تکوین پرداخته شود.

مواد و روشها

تکثیر هیدر آب شیرین (گونه *Hydra vulgaris*) در محیط آزمایشگاهی: پولیپهای آب شیرین در محلولی شامل آب مقطر و املاح با غلظتهای مشخص بر طبق روش استاندارد ندارد در ظرفهای استریل پرورش داده شد. دمای محیط به طور ثابت ۱۸ درجه سانتی گراد بوده و کلیه پولیپها ۲۴ ساعت قبل از استفاده برای آزمایشات بدون غذا نگهداری گردیدند. به منظور وارد کردن پولیپها به فاز تولید مثل غیرجنسی (جوانه زدن)، ۵ بار در هفته توسط آرتمیا (*Artemia nauplii*) مورد تغذیه قرار گرفتند. پولیپهای هیدر آب شیرین ۵ ساعت پس از تغذیه شسته و ظرفهای آنها یک بار در هفته تعویض گردید. به منظور تحریک فاز تولیدمثل جنسی فقط یک بار در هفته پولیپها توسط آرتمیا تغذیه شدند و از این طریق بیضه و تخمدان در پایه‌های مجزا شکل گرفتند. از آنجایی که سیستم عصبی پیشرفته در این جانوران وجود ندارد از لحاظ اخلاق زیستی ممانعتی برای انجام آزمایشات با این مدل وجود ندارد.

استخراج DNA، تعیین توالی و آنالیز مولکولی: با بلاست کردن پروتئینهای لایف‌گارد انسانی در کل ژنوم هیدر آب شیرین، مشخص شد که سه توالی از پروتئین لایف‌گارد به نامهای لایف‌گارد -۴ (Lfg-4) و دو هومولوگ از لایف-گارد-۱ بی مهرگان (Lfg-1ia و Lfg-1ib) در هیدر وجود دارد. جهت تکثیر ژنهای مورد نظر، ابتدا استخراج DNA هسته‌ایی با استفاده از کیت استخراج تجاری DNA به روش استاندارد انجام گردید (DNeasy Tissue Kit, Qiagen) ، حدود ۱۰۰ پولیپ برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (جدول۱)، واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) طبق برنامه زمانی با سیکلهای حرارتی به ترتیب شامل: واسرشته شدن اولیه (Denaturation) در دمای ۹۵ درجه

سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل واسرشته شدن در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) به مدت ۱ دقیقه در دمای ویژه برای هر ژن، و مرحله گسترش (Extention) در دمای ۷۲ درجه برای یک دقیقه و سی ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. پس از تعیین توالی، داده‌های حاصل در نرم افزار Geneious R6 تصحیح و با سایر توالیهای مشابه موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) همتراز گردیده و برای رسم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند. درخت فیلوژنی از روش Neighbor Joining (NJ) با استفاده از نرم افزار Geneious (Biomatters) و بوت استرپ سریع (۱۰۰۰۰ تکرار) انجام گردید.

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق

Primer	Primer sequence
Lfg-4- Forward	GAA GGAAGT TTTTCTAAAAACGAACGAG
Lfg-4- Reverse	CTGGTGATAACTTATGAATCATCATATGTG
Lfg-1ia. Forward	GTGTACGCAATTCTTTTTTGTC
Lfg-1ia. Reverse	CTC AAGAATGTAAATAAATAACAGAC
Lfg-1ib. Forward	TTATAATGTTTTGGGCAGCATG
Lfg-1ib. Reverse	TTATATCAATGTACAAGTTCAATGC

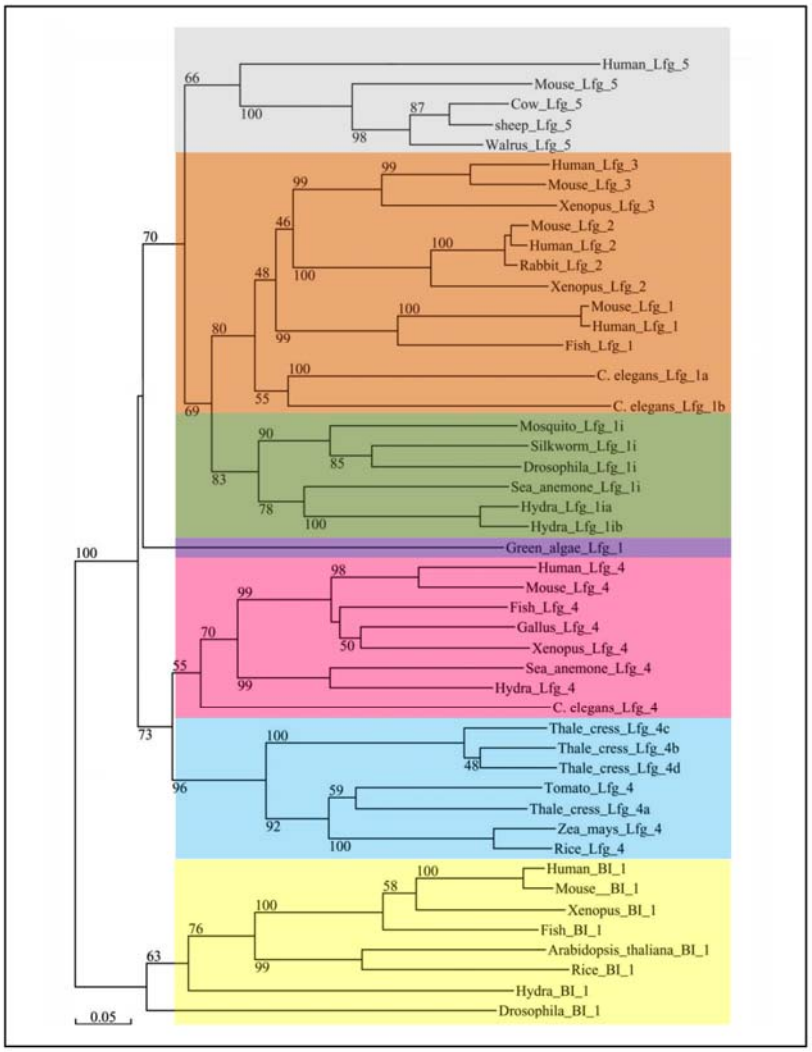
هیبریداسون درجا با استفاده از دیگوکسیژنین: پس از تکثیر ژنهای لایف‌گارد، توالی به دست آمده بر اساس پروتکل در وکتور pBluescriptII متعلق به شرکت Fermentas کلون شدند و به عنوان الگوی DNA برای تهیه پروب هیبریداسیون درجا استفاده شدند. هیبریداسیون درجا با استفاده از دیگوکسیژنین که یک نشانگر ایمنوهیستو- شیمیایی است صورت گرفت. این روش یک تکنیک بسیار قابل اعتماد است که در آن از DNA توالی مکمل نشاندار شده به عنوان پروب استفاده می شود. پروب نشاندار شده با توالی mRNA ژن مورد نظر در بافت هیبرید می شود و با دادن سیگنال در سلول یا بافتی خاص، به عنوان تأییدی برای بیان ژن مورد نظر در آن منطقه به کار می‌رود. در این آزمایش پروب ژنهای لایف-گارد، توسط دیگوکسیژنین نشاندار شدند و پس از انجام واکنشها در طی آزمایش، با ایجاد رنگ آبی تیره محل بیان ژن مورد نظر در هیدر مشخص گردید. جزئیات مراحل انجام آزمایش هیبریداسیون درجا بر اساس پروتکل استاندارد (۴) صورت گرفت.

نتایج

نتایج بررسی این توالیها نشان داد که این سه ژن به صورت کاملاً تثبیت شده و با ساختار مارپیچی آلفا در هیدر وجود دارد. ساختار آبگریز آنها نشان دهنده استقرار این پروتئینها بر روی غشای سلولی است (شکل ۳).

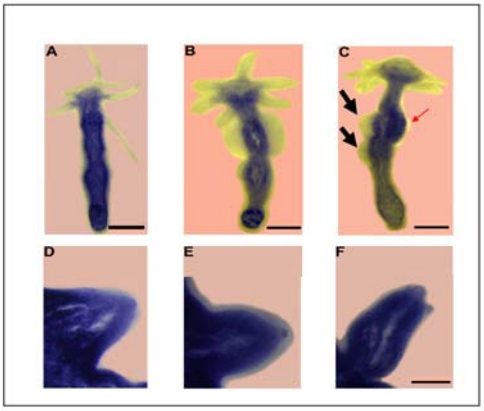
شکل۳- ساختار شماتیک پروتئینهای لایف‌گارد با ساختار مارپیچی آلفا. ساختار پروتئینی شامل هفت لوپ و مارپیچ عبور کننده از عرض غشاء برای لایف‌گارد ۴، و دو هومولوگ لایف‌گارد ۱ در بی‌مهرگان توسط برنامه TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM) پیش بینی شده است. مقیاس: ۲۰ اسید امینه.

همچنین، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک بر پایه درخت فیلوژنی برای پروتئینهای محافظ سلولی در مهره‌داران و بی‌مهرگان به دست آمد (شکل ۴). بر اساس نتایج به دست آمده، مشخص شد که دو شاخه مجزا متعلق به خانواده های پروتئینی lifeguard و Bax-inhibitor-1 وجود دارد. در میان اعضای مختلف در شاخه lifeguard، لایف گارد-۴ (Lfg-4) زودتر از دیگر اعضای این خانواده تکامل پیدا کرده است. توالیهای لایف گارد-۴ استخراج شده از هیدر آب شیرین با لایف گارد-۴ شقایق دریایی، یک گروه خواهری را ایجاد می‌کنند. دو هومولوگ Lfg-1ia و Lfg-1ib در هیدر، با دیگر گونه‌های جانوری بی‌مهره در گروه لایف‌گارد-۱ بی مهرگان قرار می‌گیرند. دیگر اعضای خانواده لایف‌گارد مانند Lfg-2، Lfg-3 و Lfg-5 در گونه-های جانوری رده های بالاتر یافت می شوند و هر یک از این پروتئینها با اعضایشان در گروههای مختلف، در شاخه مستقلی قرار می‌گیرند.



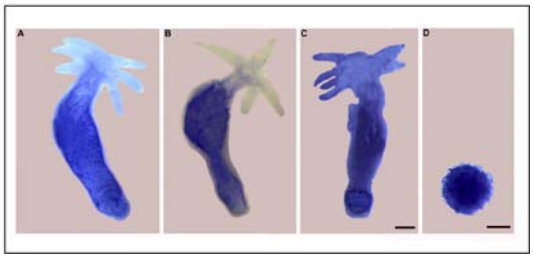
شکل۴- درخت فیلوژنی پروتئینهای تنظیم کننده آپوپتوسیز (lifeguard (LFG) and Bax-Inhibitor (BI-1)). درخت فیلوژنی بر اساس (Clastal W) هم تراز شده و از روش (Neighbor Joining, NJ) با استفاده از نرم افزار Geneious (Biomatters) و بوت استرپ سریع (۱۰۰۰۰ تکرار) ترسیم گردیده است.

نتایج بررسیها با انجام آزمایش هیبریداسیون درجا مشخص کرد که پروتئین لایف گارد-۴ (Lfg- 4) در تخمدان پولیپ ماده بیان می شود (شکل ۵c). بر خلاف روند تخمک‌زایی، بیان این پروتئین در بیضه جنس نر و اسپرم‌زایی دیده نشد (شکل b و۵c). بررسیها در زمان تولید مثل غیر جنسی هیدر (جوانه زدن)، مشخص کرد که پروتئین لایف‌گارد-۴ (Lfg- 4)، در لایه اندودرم پولیپها بیان می شود و بیان آن در لایه اکتودرم دیده نمی‌شود. به عبارت دیگر، بیان ژن لایف‌گارد-۴ در لایه اندودرمی، در مراحل مختلف جوانه زدن مشاهده می شود و در بازوهای هیدر سیگنال مربوط به بیان ژن لایف‌گارد-۴ دیده نمی‌شود (شکل ۵D-F).



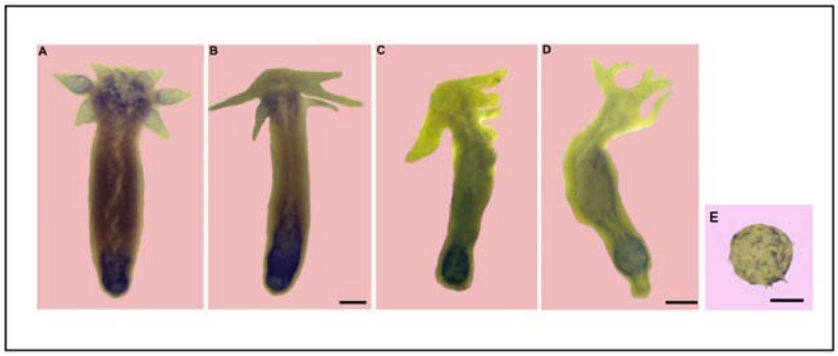
شکل۵- هیبریداسیون درجا برای ژن لایف گارد=۴. a، بیان ژن لایف گارد-۴ در پولیپ بدون جوانه و ساختارهای تولید مثل جنسی. b، پولیپ نر با دو بیضه بارز. c، پولیپ دوجنسی با بیضه‌ها که با فلشهای مشکی نشان داده شده و تخمدان با فلش قرمز. d، e و f، نشان دهنده مراحل مختلف جوانه زدن هیدر است. مقیاس: (a, b, c) 200 µm; (d, e, f) 100 µm.

بررسیهای بیشتر بر روی این پروتئین در زمان تولید مثل جنسی پولیپ ماده و مراحل مختلف تخمک‌زایی در تخمدان، مشخص نمود که علاوه بر بیان این پروتئین در لایه اندودرم، پروتئین لایف‌گارد-۴ در تمامی مراحل تخمک‌زایی بیان می شود (شکل ۶).

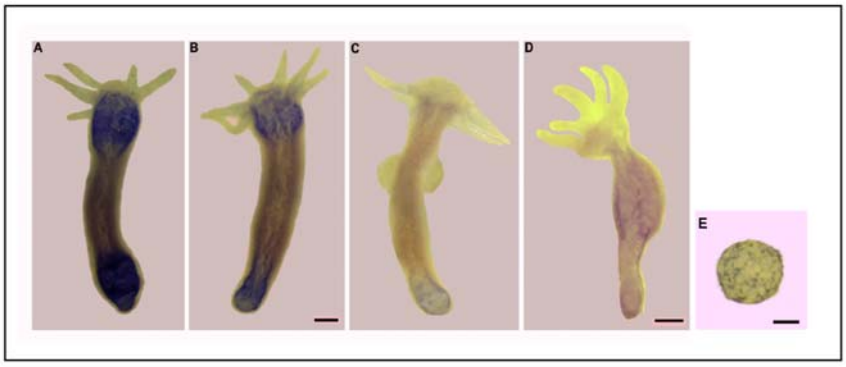


شکل ۶- هیبریداسیون درجا برای ژن لایف گارد-۴ در مراحل مختلف تخمک‌زایی پولیپ ماده. a، بیان ژن لایف گارد-۴ در پولیپ ماده که به تازگی وارد فاز تولیدمثل جنسی شده. b و c، مراحل پیشرفته تر تخمک‌زایی در پولیپ ماده. E، تخمک بالغ. مقیاس: (a, b, c) 200 µm, (d) 150 µm

در این مطالعه دو هومولوگ از لایف‌گارد-۱ بی‌مهرگان (Lfg-1ia و Lfg-1ib) موجود در هیدر نیز بررسی شدند اما با وجود تکرار آزمایشات، به غیر از بیان سیگنالهای غیرتخصصی در نواحی اطراف دهان و پا، بیان ویژه‌ایی از این پروتئینها در فاز جنسی و غیرجنسی دیده نشد (شکلهای۷ و ۸).



شکل ۷- هیبریداسیون درجا برای لایف گارد-۱ بی مهرگان (Lfg-1ia) در فاز تولید مثل غیرجنسی (a و b) . فاز تولید مثل جنسی (c و d). e، تخمک بالغ. مقیاس: (a,b) 200 µm, (c,d) 150 µm and (e) 200 µm.



شکل ۸- هیبریداسیون درجا برای لایف گارد-۱ بی‌مهرگان (Lfg-1ib) در فاز تولید مثل غیرجنسی (a و b) و در فاز تولید مثل جنسی (c و d). e، تخمک بالغ. مقیاس: (a, b) 200 µm, (c, d) 150 µm and (e) 200 µm.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار مشخص گردید که ژنهای خانواده پروتئینی لایف‌گارد در هیدر آب شیرین که ساده‌ترین جانور حقیقی (متازوآ) می‌باشد، وجود دارند. بررسیهای بیشتر و مقایسه توالیهای استخراج شده با دیگر گروههای جانوری مشخص نمود که این سه توالی، متعلق به خانواده لایف‌گارد-۴ (Lfg-4) و دو هومولوگ از لایف-گارد-1 بی مهرگان Lfg-1ia و Lfg-1ib می‌باشند. مقایسه روابط فیلوژنتیکی این پروتئینها در درخت تکاملی نشان می‌دهدکه اعضای این خانواده از لحاظ تکاملی دارای ثبات زیادی بوده (protein conserve) و توالی آنها در طول تکامل موجودات تغییر اندکی داشته است. این یافته‌ها نشان دهنده ثبات توالی ژنی پروتئینهای لایف‌گارد در هیدر آب شیرین می‌باشد و مطالعات بیشتر در رابطه با این پروتئینها می تواند مشخص کننده نقش عملکردی آنها در محافظت از سلول در مقابل مکانیسمهای مرگ برنامه ریزی شده سلولی است.

از آنجایی که در تمامی فازهای سیکل زندگی هیدر شیرین (تولید مثل جنسی و غیرجنسی)، بیان ژن لایف‌گارد -۴ در لایه اندودرم دیده می شود، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در مراحل مختلف از شروع جوانه زدن تا مرحله نهایی و کامل شدن جوانه جدید، ژن لایف گارد-۴ بیان می شود.

ژن لایف‌گارد-۴ تحت عنوان پروتئین ضد آپوپتوسیز گلژی نیز تعریف شده است و علاوه بر این از آن تحت عنوان ژن محافظ سلول (cytoprotective) نیز نام برده شده است (۵). از آنجایی که مکانیسم مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی کاملاً در مراحل مختلف تخمک‌زایی هیدر اثبات شده است (۱۱)، از این رو بیان ژنهای تنظیم کننده و مؤثر در مکانیسم آپوپتوسیز، مانند ژن لایف‌گارد در مراحل تخمک‌زایی هیدر منطقی به نظر می‌رسد. در واقع وجود ژنهای لایف‌گارد کمک می کند تا تعادلی میان حفظ و مرگ سلول ایجاد شود. هرچند مکانیسم دقیق عملکرد ژن لایف‌گارد-۴ در تنظیم آپوپتوسیز شناخته شده نیست اما آزمایشات مختلف نشان داده است که این پروتئین به طور چشمگیری در کاهش مرگ سلولی تحریک شده توسط محرکهای داخلی، نقش دارد (۵).

از آنجایی که پروتئینهای حفاظت کننده سلولی (لایف گارد) در انسان بسیار مورد بررسی قرار گرفته اند و نقش حفاظتی آنها در برابر آپوپتوسیز اثبات شده است بنابراین، این مطالعه با مشخص نمودن وجود این پروتئینها در جانوران ساده مثل هیدر آب شیرین، کمک بسیاری برای مطالعات تکاملی و نقش تکوینی این مسیرهای سیگنالی از جانوران ابتدایی تا پیشرفته می کند .علاوه بر این، یافته‌های این مطالعه نشان دهنده ثبات توالی ژنی پروتئینهای لایف-گارد در هیدر آب شیرین می‌باشد و احتمالاً نقش

عملکردی آنها در محافظت از سلول در مقابل مکانیسمهای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است.

منابع

1- Böttger A, Alexandrova O. 2007 .Programmed cell death in *Hydra*, Seminars in Cancer Biology. 17:134–146.

2- Bosch TC and David CN. 1984 .Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. Developmental Biology. 104:161–171.

3- Burns TF, El-Deir WS. 2001. Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. Journal of Biological Chemistry. 276:37879–37886.

4- Grens A, Mason E, Marsh JL, Bode HR. 1995 . Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the Hydra achaete-scute homolog has proneural activity in Drosophila. Development. 4027–4035.

5- Gubser C, Bergamaschi D, Hollinshead M, Lu X, Van Kuppeveld FJ, Smith GL. 2007. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes, PLoS Pathog. 3:e17 29.

6- Harcet M, Roller M, Cetkovic H, Perina D, et al. 2010. Demosponge EST Sequencing Reveals a Complex Genetic Toolkit of the Simplest Metazoans.Molecular Biology and Evolution. 27:2747–2275.

7- Hoffmeister S, Schaller H.C. 1985 .A new biochemical marker for foot-specific cell differentiation in hydra. Developmental Biology. 194:453–461.

8- Hu L, Smith TF, Goldberger G. 2009 . LFG: a candidate apoptosis regulatory gene family. Apoptosis. 14:1255–1265.

9- Kuznetsov S, Lyanguzowa M, Bosch TB. 2001. Role of epithelial cells and programmed cell death in Hydra spermatogenesis. Zoology. 104:25–31.

10- Lasi M, Pauly B, Schmidt N, Cikala M, Stiening B, et al. 2010. The molecular cell death machinery in the simple cnidarian *Hydra* includes an expanded caspase family and pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. Cell Research. 20:812–825.

11- Technau U, Miller MA, Bridge D, Steeleb RE. 2003 .Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis.Developmental Biology. 260:191–206

12- Zhou J, Zhu T, Hu C , Li H,. Chen G. et al., Comparative genomics and function analysis on BI1 family. Computational Biology and Chemistry.2008; 32:159–162.

Programmed cell death regulatory genes in primitive Euometazoa

Motamedi M.

Biology Dept., Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

The aim of this manuscript is investigation, extraction and expression pattern evaluation of lifeguard genes in fresh water polyp *Hydra vulgaris.* For this purpose, about 100 freshwater polyps were cultured and total DNA extraction was performed. Specific primers were designed for all genes and PCR reaction applied to amplify Lifeguard genes. In order to investigate the gene expression pattern, In situ hybridization experiment used. The experiments revealed that there are three lifeguard genes in hydra, which are called Lifeguard-4 and invertebrates' Lifeguard -1. In situ hybridization shows that Lifeguard-4 expressed in endodermic layer of polyps in all budding stages and also in different stages of oogenesis. In Conclusion, Phylogenetic tree indicates that lifeguard genes are well conserved and present at the base of Euometazoa like freshwater *Hydra* polyp. Since apoptosis signaling pathway is present during Hydra gametogenesis (oogenesis and spermatogenesis), expressions of Lifeguard-4 as an apoptosis regulatory gene, in places were apoptosis occur is logistic and confirms the regulatory function of these genes.

Key words: Apoptosis, lifeguard proteins, in situ hybridization, Euometazoa