



## مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی

فاطمه توحیدی نژاد<sup>۱</sup>، محمدرضا محمدآبادی\*<sup>۲</sup>، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه<sup>۱</sup>، عذرا نجمی نوری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

<sup>۲</sup> دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

<sup>۳</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۳۱

### چکیده

ژن Rheb تحت عنوان ژن اولیه فوری<sup>۱</sup> (IEG) برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد که دارای ۱۸۴ اسید آمینه و وزن ملکولی ۲۰۴۹۷ دالتون است. Rheb متعلق به خانواده Ras است که چارچوب کربوکسی ترمینال CAAX را کد می‌نماید که نشان می‌دهد پروتئین ممکن است تحت فارنسیلاسیون بعد از ترجمه<sup>۲</sup> قرار گیرد. Rheb یک فاکتور تنظیم کننده بالادست مسیر سیگنال‌دهی mTOR است و Rheb-GTP می‌تواند mTOR را فعال کند که القا کننده قوی فسفوریلاسیون S6K1 اندوژنوس در رزیدوهای ترئونین ۳۸۹، ترئونین ۴۲۱ و سرین ۴۲۴ می‌باشد. بیان بیش از حد Rheb رشد سلولی را تحریک می‌کند، در حالی که توقف بیان Rheb سنتز پروتئین و رشد سلولی را مهار می‌کند. بیان بیش از حد Rheb-GAP فعالیت mTOR را مهار می‌کند و ناحیه برش عرضی فیبر را در ماهیچه‌های اسکلتی پستانداران کاهش می‌دهد. بین میواستاتین و مسیرهای سیگنال‌دهی mTOR در ماهیچه‌های اسکلتی پستانداران اثر متقابل وجود دارد. نمونه‌ها از بافت‌های مغز، قلب، شش، پانکراس، طحال، کلیه، کبد و بیضه مربوط به بز کرکی راینی تهیه شدند. RNA استخراج شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNA بررسی و سنتز cDNA انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و با نرم افزار Gene Tools سطوح مختلف بیان در بافت های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت کلیه و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان می‌دهد که بیان ژن Rheb در بز کرکی راینی در بین بافت های مختلف تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد دارد. لذا می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالاً ژن Rheb در سلول های بز نقش دارد و باید در تحقیقات بعدی این نقش (ها) شناسایی شوند.

کلمات کلیدی: ژن Rheb، بز کرکی راینی، بیان، بافت.

## مقدمه

اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم بیان آن ژن می‌شود. پروتئین‌های Ras<sup>۲</sup> تنظیم کننده واکنش‌های بیوشیمیایی مختلفی در داخل سلول‌ها هستند و از جمله در تکثیر سلولی و تمایز، انتقال وزیکولی و پلاریته (قطبیت) سلولی نقش دارند (Yamagata *et al.* 1994). ژن Rheb (همولوگ Ras غنی شده در مغز<sup>۳</sup>) در یوکاریوت‌ها بسیار حفاظت شده است و در همه آنها از مخمر تا پستانداران وجود دارد (Urano *et al.* 2001). این ژن GTPase کوچکی را کد می‌کند که ارتباط نزدیکی با RAS دارد که یا در حالت فعال (باند شده به GTP) و یا در حالت غیر فعال (باند شده به GDP)، وجود دارد (Clark *et al.* 1997; Im *et al.* 2002). ژن Rheb تحت عنوان ژن اولیه فوری<sup>۴</sup> (IEG) برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد که دارای ۱۸۴ اسید آمینه و وزن ملکولی ۲۰۴۹۷ دالتون است (Yamagata *et al.* 1994). Rheb متعلق به خانواده Ras است که باکس کربوکسی ترمینال CAAX را کد می‌نماید و ممکن است پروتئین تحت فارنسیلاسیون بعد از ترجمه<sup>۵</sup> قرار گیرد (Hancock *et al.* 1989; Kinsella *et al.* 1989).

با توجه به رشد روز افزون جمعیت جهان استفاده از روش‌های نوین برای تأمین نیازهای مختلف این جمعیت عظیم ضروری به نظر می‌رسد. در کشورهای توسعه یافته پرورش دام به روش‌های علمی جایگزین روش‌های سنتی گردیده است و این امر توانسته تحول بزرگی در تولید محصولات دامی ایجاد کند. در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Ahmadikhah, 2008). ماده ژنتیکی<sup>۱</sup> یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند. نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد. بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت

<sup>2</sup> منعکس کننده اولین اعضای خانواده پروتئینی Rat sarcoma است که کشف شده و نیز به خانواده‌ای از ژن‌ها اشاره دارد که این پروتئین‌ها را کد می‌کنند.

<sup>3</sup> Ras homolog enriched in brain

<sup>4</sup> immediate early gene (IEG)

<sup>5</sup> post-translational farnesylation

<sup>1</sup> DNA

Zhang *et al.* 2003; Hay and Sonenberg 2004). Rheb یک کیناز کلیدی متصل کننده کمپلکس TSC2/TSC1 و mTOR است. شواهد نشان می‌دهد که Rheb از طریق باند کردن مستقیم Rheb-GTP به mTOR برای پیشرفت فعال سازی mTOR تنظیم mTOR را انجام می‌دهد (Long *et al.* 2005). mTOR کنترل کننده مرکزی رشد سلول است، برای رشد و توسعه اولیه سلول ضروری است، حافظه و پیری را در بزرگسالان تحت تأثیر قرار می‌دهد و در سیگنال دهی آن نقش دارند. محققین دیگر نشان داده‌اند که FKBP38 می‌تواند به mTOR باند شود تا فعالیت آن را مهار کند و Rheb-GTP به طور مستقیم با FKBP38 اثرات متقابل ایجاد می‌کند تا از همبستگی FKBP38 با mTOR جلوگیری نماید (Bai *et al.* 2007; Ma *et al.* 2008). اما، خصوصیات بیوشیمیایی جامع و گسترده اثر متقابل Rheb/FKBP38 با استفاده از سه ارزیابی در شرایط آزمایشگاهی<sup>۳</sup> مختلف مشخص نکرده است که بین Rheb و FKBP38 اثر متقابل وجود دارد (Katharina *et al.* 2009). بنابراین مکانیسم اثر متقابل بین Rheb و FKBP38 هنوز تحت شک و تردید است و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

Rheb به صورت آنتاگونیست TSC (کمپلکس اسکروزیس غده‌ای<sup>۴</sup>)، که فعال کننده فعالیت Rheb-GTPase، یعنی Rheb-GAP

اما، نکته ویژه این است که Rheb یک آرژنین به جای گلیسین در مکان ۱۲ دارد که در خانواده Ras حفاظت شده است (Lau and Nathans 1987; Saffen *et al.* 1988). دیگر پروتئین‌های Ras، نواحی با همولوژی بالا بین Rheb و خانواده Ras وجود دارد که متناظر با ۵ باکس Ras دخیل در باند شدن GTP هستند و شامل باکس G1 تا G5 هستند (Bourne *et al.* 1991). بدیهی است که Rheb یک گوانوزین تری فسفات (GTPase) کوچک شبیه Ras است که بین فرم فعال باند شده به GTP و فرم غیرفعال باند شده به GDP نوسان می‌کند (Yamagata *et al.* 2004; Aspuria and Tamanoi 1994). Rheb یک فاکتور تنظیم کننده بالادست مسیر سیگنال دهی<sup>۱</sup> mTOR (هدف متازوایی راپامایسین) است و Rheb-GTP می‌تواند mTOR را فعال کند که القا کننده قوی فسفوریلاسیون<sup>۲</sup> S6K1 اندوژنوس در رزیدوهای ترئونین ۳۸۹، ترئونین ۴۲۱، و سرین ۴۲۴ می‌باشد (Castro *et al.* 2003; Sarbassov *et al.* 2008; Sato *et al.* 2005). mTOR یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین است که با Rheb همبسته است. تنظیم کننده بالادست Rheb کمپلکس TSC2/TSC1 است که یک پروتئین فعال کننده TPase (GAP) است و مسیر سیگنال دهی mTOR را به وسیله تحریک هیدرولیز GTP فرم فعال Rheb (Rheb-GTP) به فرم غیر فعال Rheb (Rheb-GDP) مهار می‌کند (Tee *et al.* 2003; )

<sup>3</sup> *in vitro*

<sup>4</sup> tuberous sclerosis complex

<sup>1</sup> metazoan target of rapamycin

<sup>2</sup> p70S6 kinase

، ۷/۶ درصد لیزین و ۷/۶ درصد لوسین هستند. Rheb شامل ناحیه‌ای از Ras است که از اسیدآمین شماره ۴ شروع شده و در اسیدآمین شماره ۱۷۰ به پایان می‌رسد.

این ژن شامل جابجایی منطقه I از اسیدآمین ۳۶ تا ۴۳ و جابجایی منطقه II از اسیدآمین ۶۲ تا ۸۰ می‌باشد. آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داده است که ژن Rheb یک جایگاه N-glycosylation، سه جایگاه فسفریل دارکردن پروتئین کیناز C، دو جایگاه فسفریل دارکردن کیناز کازئین II، چهار سیگنال هدف گیرنده انتهای C میکروبادی‌ها<sup>۴</sup>، دو جایگاه اتصال ATP/GTP موتیف A (P-Loop) و یک جایگاه اتصال گروه 1 prenyl (باکس CAAX) دارد (Zheng et al., 2011). فعالیت Rheb توسط فاکتورهای رشد، قابلیت دسترسی به مواد مغذی و ATP سلولی و سطح اکسیژن تنظیم می‌شود (Buerger et al., 2006).

(پروتئین فعال کننده GTPase)<sup>۱</sup> است عمل می‌کند (شکل ۱). سلول‌هایی که فعالیت TSC-Rheb-GAP آنها از بین رفته است فعال سازی ساختاری سیگنال دهی TORC1<sup>۲</sup> (کمپلکس هدف راپامایسین ۱) را نشان می‌دهند. مکانیسم‌های عمل اسیدهای آمینه در کنترل سیگنال دهی TOR و مکانیسم آن در کنترل عمل Rheb هنوز به خوبی درک نشده‌اند. غیرفعال سازی سیگنال دهی TORC1 محروم از مواد مغذی می‌تواند به وسیله بیان بیش از حد Rheb نوترکیب محفوظ شود. Rheb به عنوان تنظیم کننده مثبت سیگنال دهی TOR به وسیله باند شدن به لوب آمینوترمینال دامین کاتالیتیک mTOR عمل می‌کند. فعال سازی ساختاری Rheb ترانسفورماسیون آنکوژنیک را از طریق پروتئین TOR القا می‌کند (Jiang and Vogt, 2008). Rheb همچنین به طور مستقل از TOR تنظیم جنبه‌های مختلف عمل سلولی نقش ایفا می‌کند. در پژوهشی Rosel et al. (2012) نشان دادند که Rheb فاگوسیتوز را در مسیر وابسته به TORC2 و مسیر مستقل از AKT (پروتئین کیناز B)<sup>۳</sup> در این سیستم مدل مهار می‌کند.

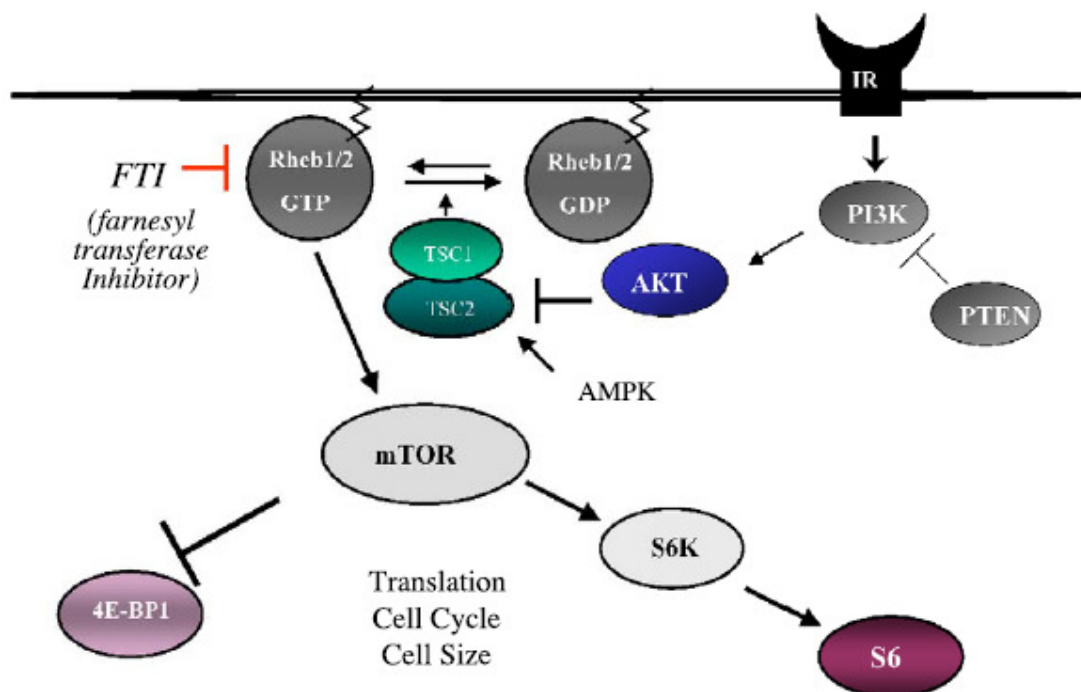
ژن کد کننده Rheb در بز ۵۵۵ bp طول دارد. وزن مولکولی پیش بینی شده برای پروتئین ویرایش نشده آن ۲۰۳۵۸ دالتون و نقطه ایزوالکتریک تخمین زده شده (PI) برابر ۶/۲۷ است. اسیدهای آمینه اصلی شامل ۱۰/۳ درصد سرین، ۹/۲ درصد ایزولوسین، ۹/۲ درصد والین

<sup>1</sup> GTPase-activating protein

<sup>2</sup> The target of rapamycin complex 1

<sup>3</sup> Protein kinase B

<sup>4</sup> Microbodies C-terminal targeting signal



شکل ۱- محل Rheb در قسمتی از مسیر سیگنالی Insulin/mTOR/S6K در سلول های پستانداران (Yamagata *et al.*, 1994).

Figure 1- Rheb position in part of Insulin/mTOR/S6K signaling pathway in mammalian cells (Yamagata *et al.*, 1994).

شده است، اما عملکردهای فیزیولوژیک آن به طور کامل مطالعه نشده است و نیاز است که شفاف سازی در این زمینه صورت گیرد. با همه این وجود این ژن در ایران روی هیچ یک از دام-های کشور مورد مطالعه قرار نگرفته است، لذا هدف این مطالعه بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی و مقایسه سطوح مختلف بیان آن برای اولین بار بود.

#### مواد و روش ها

برای تهیه نمونه های بافتی شامل مغز، قلب، شش، پانکراس، طحال، کلیه، کبد و بیضه

غیر فعال شدن موتاسیونی ژن Rheb، باعث ایجاد سلول هایی با سایز کوچک می شود و از طرف دیگر بیان بالای ژن Rheb باعث افزایش عمده سایز سلولی می شود (Long *et al.*, 2007). بیان بیش از حد Rheb رشد سلولی را تحریک می کند، در حالی که توقف بیان Rheb سنتز پروتئین و رشد سلولی را مهار می کند (Aspuria and Tamanoi, 2004). بیان بیش از حد Rheb- GAP فعالیت mTOR را مهار می کند و ناحیه برش عرضی فیبر را در ماهیچه های اسکلتی پستانداران کاهش می دهد (Wan *et al.*, 2006). اگرچه ژن Rheb در موش، بز و انسان شناسایی

اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد ( RerertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این امر از مقدار ۱۰ ng-۵۰۰ ng از RNA کل یا ۱ ng-۵۰۰ ng از Poly (A) mRNA استفاده می شود. ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید، لذا جهت یکسان کردن RNA به کار رفته برای ساخت cDNA، مقدار ۱ میکروگرم از RNA به کار رفت. برای انجام واکنش های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس می-تواند مستقیماً برای PCR استفاده شود و یا در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای کمتر از یک هفته نگهداری شود. برای نگهداری در زمانی طولانی تر، ذخیره در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد توصیه می شود.

واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از PCR Master Kit (PR8251C) شرکت سینا ژن صورت گرفت. توالی پرایمر پیشرو و برگشتی Rheb به ترتیب 5'-ATG CCG CAG TCC 3'- و 5'-TCA CAT CAC CGA AAG TCC-3' (شرکت ژن فن آوران) (Zheng *et al.*, 2011) و توالی پرایمر پیشرو و برگشتی بتاکتین به ترتیب 5'-TGG CAC CAC 3'- و 5'-CGT ACC TTC TAC AAC GAG-3' CCC CAG AGT CCA TGA CAA TG-3'

(از هر بافت ۳ تکرار) مربوط به بز کرکی رائینی اقدام به خریداری یک بز نر ۱۷ ماهه کرکی رائینی از گله ای واقع در شهرستان جیرفت شد. بزهای موجود در این گله فقط از نژاد کرکی رائینی بودند که از مرکز اصلاح نژاد بز کرکی رائینی واقع در شهرستان بافت خریداری شده بودند. بلافاصله پس از کشتار قطعات کوچکی از اندام های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر چند عدد از میکروتیوب ها در داخل یک فویل آلومینیومی قرار داده شد و سریعاً به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از انجماد سریع نمونه ها در داخل فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

پایداری RNA از DNA کمتر است و نسبت به تخریب در هنگام جمع آوری، فرآیند کردن و نگهداری نمونه بسیار حساس تر است. توالی های بلند RNA به سادگی تخریب می شوند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase<sup>۱</sup> انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC<sup>۲</sup> (سیناژن، MR8244) از RNase<sup>۳</sup> عاری شدند. برای استخراج RNA از نمونه های بافتی فوق (از هر بافت ۳ تکرار) از کیت استخراج RNA شرکت دنازیست آسیا (S-1020) استفاده گردید. RNA استخراج شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری و کیفیت و کمیت RNA با روش های

<sup>۱</sup>RNase-free environment

<sup>۲</sup>Di Etyhyl Pyro Carbonate water

<sup>۳</sup>RNase-free

نمونه های RNA در نسبت طول موج A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> بود (شکل ۱). همانطور که در شکل ۲ مشخص است دو باند S ۱۸ و S ۲۸ به وضوح ملاحظه می شود.

مشاهده تک باند در محدوده ۵۵۵ bp برای پرایمر Rheb و در محدوده ۲۲۹bp برای بتاآکتین در مورد تمامی نمونه ها، بیانگر صحت انجام PCR و مراحل قبلی آزمایش می باشد (شکل ۳). نتایج حاصل نشان داد که این ژن در تمام بافت های مورد بررسی بیان می شود. در بررسی دقیق بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از نرم افزار Gene Tools دیده شد که این ژن به مقدار زیادی<sup>۱</sup> در بافت کلیه بیان شده است و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شده است (شکل ۴).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار SPSS نشان می دهد که بیان ژن Rheb در بز کرکی راینی در بین بافت های مختلف تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد دارد (جدول ۱).

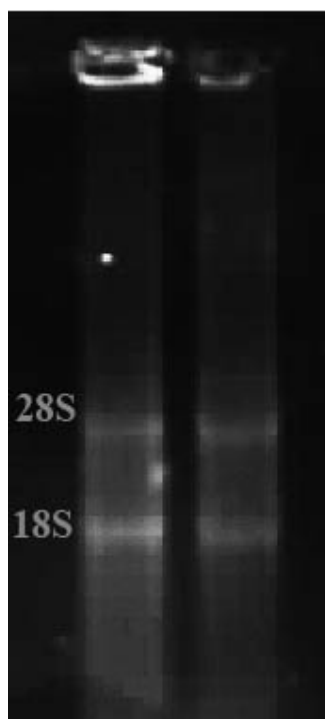
(شرکت سیناژن) بود (Zheng *et al.*, 2011). مقادیر مختلف اجزای واکنش PCR شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix با غلظت ۱x، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت با غلظت ۱-۰/۱ μM، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۱-۰/۱ μM، ۲ میکرولیتر cDNA با غلظت ۱۰pg-۱ و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. شرایط انجام واکنش PCR به صورت واسرشت کردن اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، انجام ۳۵ سیکل با شرایط واسرشت کردن در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتز نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.

محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از پایان آزمایشات مولکولی، با استفاده از تصویر گرفته شده توسط دستگاه تصویربرداری از ژل و نرم افزار Gene Tools (۳.۰۷.۰۲) سطوح مختلف بیان در بافت های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نرم افزار SPSS معنی داری نتایج مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف معنی دار بین گروهها از آزمون دانکن و درجه معنی داری  $P \leq 0/01$  استفاده شد.

## نتایج و بحث

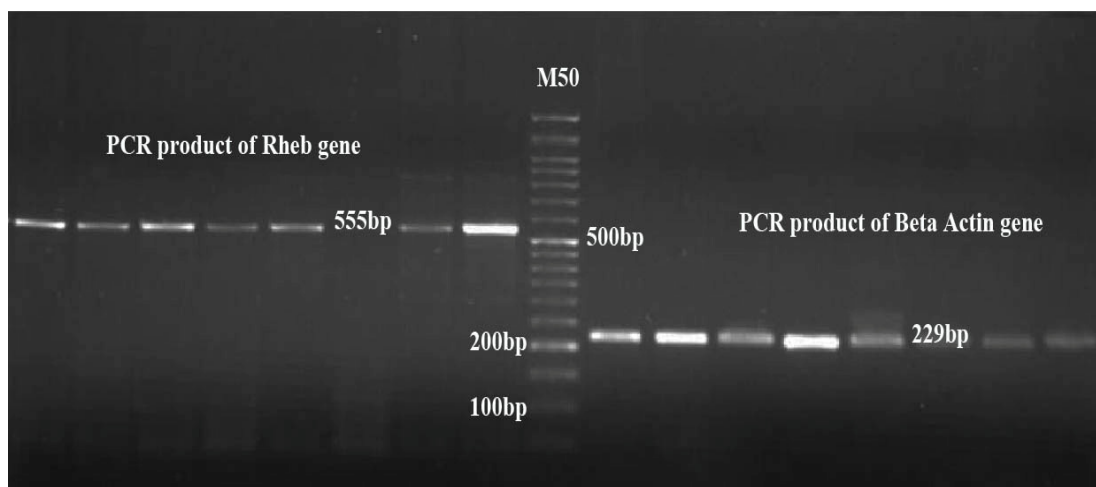
نتایج حاصل از بررسی اعداد جذب نمونه های استخراج شده در دستگاه اسپکتروفتومتری بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب

<sup>1</sup> over expression



شکل ۲- نمونه هایی از RNA های استخراج شده.

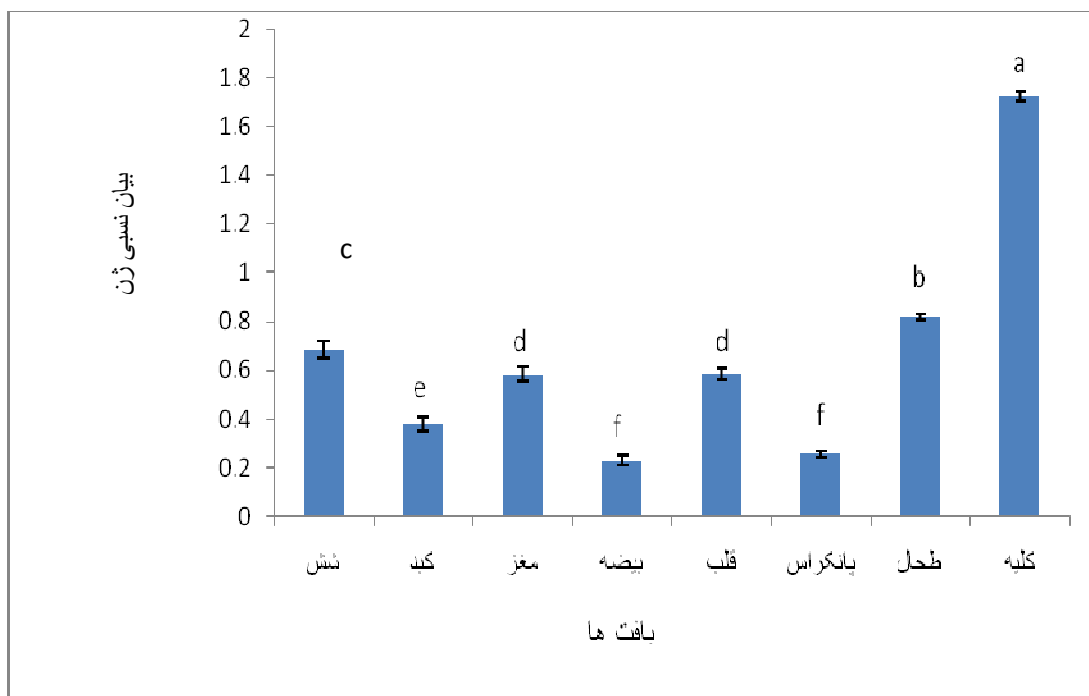
Figure 2- Samples of the extracted RNA.



شکل ۳- الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای Rheb و بتا اکتین (کنترل). M50؛ نشانگر اندازه.

Figure 3- Electrophoresis of studied samples using Rheb and beta Actin (control) primers. M50; size marker.





شکل ۴- سطوح مختلف بیان نسبی ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی (از ۰ تا ۲۰۰ درصد).

Figure 4- different levels of Rheb gene relative expression in different tissues of Raini Cashmir goat (from 0 to 200%).

جدول ۱- تجزیه واریانس بیان ژن Rheb در بز کرکی راینی در بین بافت های مختلف.

Table 1- ANOVA of Rheb gene expression in Raini Cashmir goat between different tissues.

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	معنی داری
	Sum of Squares	df	Mean Square		Sig.
Between Groups	بین گروه ها 4.782	7	0.683	1171.1	0.000
Within Groups	داخل گروه ها 0.009	16	0.001	17	
Total	کل 4.791	23			

روی ژن Rheb در انسان نشان داده است که سطح بالایی از آن در قلب و ماهیچه های اسکلتی بیان شده است. اما، در بررسی Eom *et al.* (2008) ژن Rheb در انسان به میزان زیادی در خیلی از بافت های بدن از جمله شش، کلیه، پوست و روده بیان شده است. در بررسی دیگری هم که توسط Gromov *et al.* (1995) بر روی بافت های مختلف انسان انجام شده بود، مشاهده شده که این ژن در بافت های مختلف انسان بیان شده و بیشترین سطح بیان در ماهیچه های قلبی و اسکلتی (و نه در مغز) دیده شد و کمترین سطح بیان در شش و کبد مشاهده شد. اما در بررسی دیگری روی انسان توسط Saito *et al.* (2005) بیشترین سطح بیان در مغز و کمترین سطح بیان طحال مشاهده شد. در تحقیق حاضر، از لحاظ بیان ژن Rheb، بین نمونه های قلب با مغز و بین نمونه های پانکراس با بیضه تفاوت معنی داری وجود نداشت، اما بین سایر گروهها تفاوت معنی دار وجود داشت ( $P < 0.01$ ). لذا، می توان نتیجه گرفت که ژن Rheb نقش مهمی را در سلول های بز ایفا می کند.

در این پژوهش بیان ژن Rheb در هشت اندام مختلف بز کرکی رائینی با استفاده از روش RT PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت کلیه و کمترین سطح بیان در بافت های پانکراس و بیضه مشاهده شد. در بررسی مشابهی که توسط Zheng *et al.* (2011) بر روی بز کرکی مغولی انجام شده بود بیشترین سطح بیان در مغز دیده شده بود و بیان آن در قلب و طحال محدود شده بود، که این نتایج با نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت دارد که شاید دلیل آن تفاوت در ژنوتیپ، تأثیر محیط بر روی ژنوتیپ، سن، جنس و نوع تغذیه باشد که باید در پژوهش های بعدی مد نظر قرار گیرد. در پژوهش صورت گرفته روی این ژن توسط Yamagata *et al.* (1994) در موش دیده شد که ژن Rheb در سطوح بالایی در هیپوکامپوس و کورتکس مغزی بیان شده است و در بافت های شش، تیموس، کلیه و روده هم به میزان زیادی بیان شده است. در بررسی های صورت گرفته توسط Tabancay *et al.* (2003) بر

## منابع

- Ahmadikhah A (2008). *Advancsd Genetics. Publication of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan (In Farsi)*.
- Aspuria PJ, Tamanoi F (2004). The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Singnal* 16: 1105-1112.
- Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang Q J, Liu Y, Jiang Y (2007). Rheb activaties mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor FKBP38. *Science Magazine* 318: 977-980.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-127.

- Buerger C, DeVries B, Stambolic V (2006). Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344: 869–880.
- Castro AF, Rebhun JF, Clark GJ, Quilliam LA (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 32493-32496.
- Clark GJ, Kinch MS, Rogers-Graham K, Sebt SM, Hamilton AD and Der CJ (1997). The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *Journal of Biological Chemistry* 272: 10608–10615.
- Eom M, Han A, Yi SY, Shin JJ, Cui Y, Park KH (2008). RHEB expression in fibroadenomas of the breast. *Pathology International* 58: 226–232.
- Gromov PS, Madsen P, Tomerup N, Celis JE (1995). A novel approach for expression cloning of small GTPases: identification, tissue distribution and chromosome mapping of the homolog of rheb. *FEBS Letters* 377: 221–226.
- Hancock JF, Magee AI, Marshall CJ (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57: 1167-1177.
- Hay H, Sonenberg N (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Gene and Development* 18: 1926-1945.
- Im E, von Lintig FC, Chen J, Zhuang S, Qui W, Chowdhury S, Worley PF, Boss GR and Pilz RB (2002). Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. *Oncogene* 21: 6356–6365.
- Jiang H and Vogt PK (2008). Constitutively active Rheb induces oncogenic transformation. *Oncogene* 27: 5729–5740.
- Katharina U, Matthias W, Reinhard W, Gunter F, Alfred W, Lgnacio R (2009). Reassessment of the role of FKBP38 in the Rheb/Mtorc1 pathway. *FEBS Letters* 583: 965-970.
- Kinsella BT, Erdman RA, Maltese WA (1991). Posttranslational modification of Ha-ras p21 by farnesyl versus geranylgeranyl isoprenoids is determined by the COOH-terminal amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 8934-8938.
- Knox JP (1995). The extracellular matrix in higher plants. Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. *The FASEB Journal* 9: 1004-1012.
- Lau LF, Nathans D (1987). Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 1182-1186.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Busch S, Avruch J (2007). The Rheb Switch 2 Segment Is Critical for Signaling to Target of Rapamycin Complex. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 18542–18551.
- Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J (2005). Rheb binds and regulates mTOR kinase. *Current Biology* 15: 702-713.
- Ma D, Bai X, Guo S, Jiang Y (2008). The switch I region of Rheb is critical for its interaction with FKBP38. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 25963-25970.
- Rosel D, Khurana T, Majithia A, Huang X, Bhandari R and Kimmel AR (2012). TOR complex 2 (TORC2) in *Dictyostelium* suppresses phagocytic nutrient capture independently of TORC1-mediated nutrient sensing. *Journal of Cell Science* 125: 37–48.
- Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM (1988). Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 7795- 7799.

- Saito K, Araki Y, Kontani K, Nishina H, Katada T (2005). Novel Role of the Small GTPase Rheb: It's Implication in Endocytic Pathway Independent of the Activation of Mammalian Target of Rapamycin. *Journal of Biochemistry* 137: 423-430.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005). Growing role for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology* 17: 596-607.
- Sato T, Umetsu A, Tamanoi F (2008). Characterization of the Rheb-mTOR signaling pathway in mammalia cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR. *Methods Enzymol* 438: 307-320.
- Tabancay AP, Gau CL, Machado IMP, Uhlmann EJ, Gutmann DH, Guo L, Tamanoi F (2003). Identification of Dominant Negative Mutants of Rheb GTPase and Their Use to Implicate the Involvement of Human Rheb in the Activation of p70S6K. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 39921-39930.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPaseactivating protein complex toward Rheb. *Current Biology* 13: 1259-1268.
- Urano J, Ellis C, Clark GJ and Tamanoi F (2001). Characterization of Rheb functions using yeast and mammalian systems. *Methods in Enzymology* 333: 217-231.
- Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, Worley PF (1994). Rheb, a growth factor-and synaptic-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 16333-16339.
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature Cell Biology* 5: 578-581.
- Zheng Xu, Yang JF, Wang XJ, Liang Y, Wu ML, Shi JJ, Zhang T, Qin Y, Li SY, Hao XY, Wang ZG, Liu DJ (2011). Molecular Characterization and Expression Pattern of Rheb Gene in Inner Mongolia Cashmere Goat (*Capra hircus*). *Agricultural Sciences in China* 10: 1452-1458.

## Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat

Tohidi nezhad F.<sup>1</sup>, Mohammadabadi M.R.\*<sup>2</sup>, Esmailzadeh A.K.<sup>2</sup>, Najmi Noori A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.

<sup>3</sup> MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Yasouj University.

### Abstract

Rheb (Ras homolog enriched in brain) gene is originally identified as immediate early gene (IEG) in 1994, encoding 184 amino acids with a deduced molecular mass of 20 497 Da in hippocampus. Rheb belongs to Ras family that encodes a carboxylterminal CAAX box indicating that the protein may undergo post-translational farnesylation. Rheb is an upstream regulatory factor in mTOR signaling pathway and the Rheb-GTP can active mTOR that inducing strong phosphorylation of endogenous S6K1 at residues Thr389, Thr421 and Ser424. Overexpression of Rheb stimulates cell growth while knockdown of Rheb expression inhibits protein synthesis and cell growth in insects. Over expression of Rheb-GAP inhibits mTOR activation and reduces fiber cross-sectional area in mammalian skeletal muscle. There is cross-talk between Mstn and mTOR signaling pathways in mammalian skeletal muscles. Tissues including brain, heart, lung, pancreatic, spleen, kidney, liver and testis were collected from the Raini Cashmir goat after slaughter. Extracted RNA were immediately stored at -80°C. Quality and quantity of RNA were evaluated and cDNA was synthesized and PCR was performed. PCR Products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and were evaluated different levels of expression in studied different tissues. Results showed that the Rheb gene was expressed in all the tested tissues and the highest level of expression was observed in kidney and the lowest level was detected in pancreatic and testis. Results of SPSS analyziz demonstrated that expression of Rheb gene in Raini cashmir goat significantly ( $P \leq 0.01$ ) is different in various tissues. Hence, can suggest that Rheb has probably role in goat cells and must detect in future investigations.

**Keywords:** *Rheb gene, Raini Cashmir Goat, Expression, tissue.*

---

\* Corresponding Author: Mohammadabadi M.R. Tel: 09133987534 Email: [mmohammadabadi@yahoo.ca](mailto:mmohammadabadi@yahoo.ca)

