التعبير الجيني وتوصيف منطقة مستقبلات ج-بروتين المقترنة الخاصة بجين-١ لداء تكيس الكلى المتعدد

إعداد

الاء مقبل السرحاني

إشراف

الدكتورة: هالة سالم سنبل

المستخلص

يعتبر داء الكُلى متعدد التكيسات - الصبغي الجسدي السائد وراثيًا اضطرابًا وراثيًا شائعًا، وينتج عن طفرة جينية في الجين الخاص بداء الكُلى متعدد التكيسات الأول أو الثاني (PKD1 أو PKD2)، ويستخدم لترميزه كلًا من بروتين بوليسيستين -١ وبروتين بوليسيستين -٢ على التوالي، ويعد داء الكُلى متعدد التكيسات - الصبغي الجسدي السائد وراثيًا من الأمراض الجهازية التي تؤثر على باقي أعضاء الجسد وذلك على الرغم من أن الكُلى فقط هي العضو المتأثر بشكل أساسي. يتميز داء الكُلى متعدد التكيسات - الصبغي الجسدي السائد وراثيًا بزيادة تكاثر الخلايا واضطراب في المصفوفة خارج الخلية وتغيير قطبية الخلية، وتتسبب هذه التغيرات في تكون الكيسات، ويتسبب وجود الطفرة في الجين الخاص بداء الكُلى متعدد التكيسات الأول بنسبة ٨٥٪ في داء الكُلى متعدد التكيسات - الصبغي الجسدي السائد وراثيًا.

يحتوي بروتين بوليسيستين -١ على منطقة خارج الخلية والتي تحتوي على العديد من نطاقات سلاسل الببتيدات المحددة جيدًا والتي تُظهر أنها تشترك في تفاعلات الخلية الخلوية وتفاعلات المصفوفة الخلوية أو كليهما، ولقد ركزنا في هذه الدراسة على واحدة من المناطق ألا وهي نطاقات موقع الإنزيمات المحللة للبروتين ج (البروتياز)، وتهدف هذه الدراسة إلى دراسة تفاعل مجال موقع الإنزيمات المحللة للبروتين ج (البروتياز) لبروتين بوليسيستين -١ مع مختلف مكونات المصفوفة خارج الخلية. من خلال دراسة هذه التفاعلات، يمكننا فهم أهميتها المحتملة في كل من النمو الطبيعي للكلى والآليات الأساسية لداء الكُلى متعدد التكيسات - الصبغي الجسدي السائد وراثيًا، ولأجل تحقيق هذا الهدف، تم تكبير منطقة موقع الإنزيمات المحللة للبروتين ج (البروتياز) الخاصة ببروتين بوليسيستين -١ من الحمض النووي الجيني واستنساخها إلى تخليق بلازميد PET-21a MBP-(+) (TEV). تم تخليق موقع الإنزيمات المحللة للبروتين ج (البروتياز) الخاص بالبروتين المرتبط بالمالتوز في بكتريا الإشريكية القولونية (ايشريشيا كولاي) وتنقيتها باستخدام تقنية فصل الجزيئات عن طريق التحليل الكروماتوجرافي لتقارب المعادن غير المتحركة، وأنشأ موقع الإنزيمات المحللة للبروتين ج (البروتياز) الخاص بالبروتين المرتبط بالمالتوز واستُخدمت لتتبع تكاثر خلايا الكلى الجنينية البشرية رقم ٢٩٣، مما أدى إلى انخفاض كبير في معدل الانتشار المعتمد على الجرعة.

الكلمات المفتاحيه:بروتين بوليسيستين -١، داء الكُلى - السائد.

Expression and Characterization of G-protein Coupled Receptor Proteolytic Site of Polycystic Kidney Disease-1 Gene Product

By

Alaa Muqbil Al-sirhani

Supervised By:

Dr. Hala Salim Sonbol

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a prevalent hereditary disorder primarily affecting the kidneys. It is caused by mutations in either the *PKD1*or *PKD2* genes, encoding the proteins polycystin-1 and polycystin-2, respectively. ADPKD is characterized by aberrant cell proliferation, perturbed extracellular matrix dynamics, and disrupted cellular polarity, resulting in the formation of renal cysts. The PKD1 gene mutation accounts for approximately 85% of ADPKD cases. This thesis focuses on investigating the role of the G-proteolytic site domain (GPS) within polycystin-1, a membrane protein with distinct peptide domains implicated in cell-cell and cell-matrix interactions. The primary objective is to elucidate the interactions between the GPS domain and various components of the extracellular matrix (ECM), aiming to uncover their significance in healthy kidney development and the underlying mechanisms driving ADPKD pathogenesis. To accomplish this, the GPS region of polycystin-1 was amplified from genomic DNA and subsequently cloned into the pET-21a(+)-MBP(TEV) expression vector. The resulting fusion protein, MBP-His-GPS, was expressed in Escherichia coli and purified utilizing an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) column. Functional characterization of MBP-GPS was conducted by examining its impact on the proliferation of human embryonic kidney epithelial cells (HEK-293). The findings revealed a significant dose-dependent reduction in cell proliferation rates upon exposure to the fusion protein. Furthermore, pull-down experiments employing MBP-GPS were performed on HEK-293 cells to identify putative interacting proteins associated with the GPS domain. The resulting cell lysate was subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and the peptides resulting from tryptic digestion were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

Key words: Polycystin-1, ADPKD, G-proteolytic site (GPS) domain.