مقاله پژوهشی

بررسی الگوی بیانی ژن PEP طی تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای قلبی

فائزه قزوینی زادگان[1]،سید مهدی کلانتر[1]، کامران قائدی[2و3]، مطهره سادات‌هاشمی[2]، محمد حسین نصر اصفهانی[2و1*]

۱. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد
۲. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهي، مرکز تحیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری سلولی، اصفهان، ایران
۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

چکیده

ژن Fndc5 که با نام دیگر پروتئین پروکسیزومی (PEP) شناخته شده است کد کننده پروتئینی حاوی ۲۰۹ اسید آمینه می‌باشد. این ژن به طور عمده در بافت‌های قلب ، ماهیچه‌های اسکلتی و مغز بیان میشود. این مطالعه جهت روشن شدن الگوی بیان این ژن در هنگام تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به سلولهای قلبی صورت پذیرفت. بنابراین سلول‌های بنیادی جنینی موشی به عنوان مدل مناسب برای تمایز قلبی القا شده با آسکوربیک اسید به کار گرفته شدند و الگوی بیانی ژن PEP در مراحل مشخصی از تمایز توسط real-time PCR بررسی شد. نتایج نشان دهنده ی افزایش چشمگیر بیان ژن PEP در کاردیومیوسیت‌های بالغ بود. در نتیجه افزایش بیان ژن PEP احتمالا در مراحل انتهایی کاردیوژنز دارای نقش احتمالی می‌باشد که جهت مشخص شدن آن نیازمند مطالعات بیشتر می‌باشد.

واژگان کلیدی: پروتئین پروکسیزومی؛ تمایز قلبی؛ سلولهای بنیادی جنینی موش؛ real-time PCR

مقدمه

پروتئین پراکسی زومی[1] که با نام دیگر Fibronectin type III domain 5 (Fndc5) شناخته شده میباشد در برگیرنده ۲۰۹ اسید آمینه است که کلونینگ cDNA آن در موش در سال ۲۰۰۲ میلادی صورت گرفته است. مشاهدات ابتدایی نشان داد که بیان ژنPEP به تدریج در بافت قلب جنین موش افزایش می‌یابد و در بافت قلب موش بالغ به حداکثر بیان خود می‌رسد. همچنین بررسی‌های انجام شده نشان داده که بیان این ژن در سلولهای میوبلاستی دودمان C2C12 تمایز یافته به میوتوب دو برابر شده است (۱). در مطالعات جدیدتر توسط بوستروم و همکاران نشان داده شد که فعالیت‌های بدنی منجر به افزایش بیان ژن PGC1a سبب افزایش بیان ژن PEP در ماهیچه و ترشح محصولی از سلولهای ماهیچه ای بنام Irisin به درون خون میشود. ایریزین به عنوان یک میوکاین عمل نموده و با افزایش بیان ژن کد کننده پروتئین Uncoupler در میتوکندری‌های سلولهای چربی موجب تبدیل بافتهای چربی سفید به قهوه ای میگردد. در نتیجه فرایند ترموژنز یا گرمازایی افزایش یافته و با آزاد سازی انرژی به صورت گرما باعث کاهش وزن می‌شود(۲). همچنین مطالعات موید بیان بالای ژن کد کننده پروتئین PEP در قلب انسان بالغ و نیز مشابهت Irisin در بین گونه‌های پستانداران است به نحوی که این پروتئین بین انسان و موش مشابهت فراوانی دارد(۲). به نظر میرسد این پروتئین در فرایندهای سلولی است دارای نقش فیزیولوژیکی مهمی بخصوص در بافت قلبی باشد. بخصوص آنکه،

* دکتر محمد حسین نصر اصفهانی،PhD
پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهي، مرکز تحیقات علوم سلولی، اصفهان، ایران
تلفن: ۰۳۱۱-۹۵۱۵۶۹۴ نمابر: ۰۳۱۱-۹۵۱۵۶۹۴
پست الکترونیک: mh_nasr@ royaninstitute.org
تاریخ دریافت:۹۱/۰۷/۰۳. تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۹/۲۵

1. Peroxisomal Protein (PEP)

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات زمینه ای نشان داده است که کاهش بیان ژن PEP زمینه ساز فعالیت آئروبیک کاهش یافته در بیماران سکته قلبی میباشد(۴). از آنجا که سلول‌های بنیادی جنینی قادرند به انواع رده‌های سلولی مشتق از سه لایه زاینده جنینی[۲] تمایز یابند. این ویژگی ، سلول‌های بنیادی را قادر ساخته تا به عنوان یك مدل بتوان از آن در مطالعات تکوین جنین و چگونگی تشکیل انواع رده‌های سلولی استفاده کرد. بنابراین با القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلولهای قلبی در محیط آزمایشگاهی[۳]، میتوان فرآیند کاردیوژنز را در جنین الگو برداری نماییم(۵و۶).

از آنجاییکه درمطالعات گذشته نشان داده شده است که بیان ژن PEP در بافت قلب بالغ بالا است (۱و۳)، برای مشخص شدن تاثیر بیان پراکسیزومال پروتئین (PEP) بر روند تمایز قلبی سلولهای بنیادی نیاز است که در ابتدا بیان این ژن در روند مذکور بررسی گردد. بنابراین، هدف این مطالعه دست یابی به الگوی بیان ژن PEP در طی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلولهای قلبی القا شده با آسکوربیک اسید در سلول‌های بنیادی جنینی موش است.

مواد و روشها:

کشت سلولهای بنیادی جنینی

در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی رده Royan B1 که از موشهای نژاد CBL576 مشتق شده بودند واز گروه سلولهای بنیادی پژوهشگاه رویان هدیه گرفته شده بودند، استفاده شد. تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول بنیادی بر روی فلاسکهای کشت سلولی ژلاتینه شده که قبلاً با سلولهای تغذیه کننده پوشیده شده بودند، کشت داده شدند. محیط مورد استفاده شامل: Knockout DMEM (Gibco)، سرم ۱۵ درصد (ES-FCS, Gibco)، بتامرکاپتواتانول (Sigma)، ال-گلوتامین ۲ میلی مولار (Gibco)، اسیدهای آمینه غیرضروری (Sigma)، پنی سیلین- استرپتومایسین (Gibco) و LIF (Chemicon) بود. سلولهای بنیادی جنینی به همراه محیط کشت آنها در دی اکسیدکربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجهی سانتیگراد کشت و نگهداری شدند.

تهیه و تمایز اجسام شبه جنینی به کاردیومیوسیت

در تلاش برای بررسی روند الگوی بیان ژن PEP در طی تمایز به سلولهای قلبی ، سلول‌های بنیادی جنینی موشی القا شده توسط آسکوربیک اسید در کشت چسبنده به عنوان مدل کاردیوژنز استفاده شدند. بدین نحو که پس از جدا سازی سلولهای بنیادی جنینی از سلولهای فیبروبلاستی جهت تهیه اجسام شبه جنینی به روش قطرات آویزان[۴]، قطرات μL20 حاوی ۸×۱۰^{۲} سلول در هر قطره در محیط K-DMEM Gibco,10829-018حاوی (Gibco) 15%ES-FCS و اسید آسکوربیک (Sigma,A4403) با غلظت نهایی $۱۰^{-۴}$M داخل درب ظروف کشت باکتریایی حاوی آب مقطر استریل به مدت دو روز در ۳۷ °C و $CO_۲$ ۵٪ کشت داده شدند (مرحله تشکیل اجسام شبه جنینی). پس از این مدت، اجسام شبه جنینی به مدت ۵ روز در ظروف باکتریایی به صورت سوسپانسیون کشت داده شده و هر ۲ روز یکبار محیط کشت تعویض و در این مدت همچنان اسید آسکوربیک با غلظت ذکر شده اضافه شد. سپس در روز ۷ اجسام شبه جنینی در ظروف ۲۴ خانه که با ژلاتین۱٪ پوشش داده شده اند به همراه محیط کشت سلول بنیادی بدون LIF و آسکوربیک اسید در ۳۷ °C و $CO_۲$ ۵٪ کشت داده شدند. پس از ۵ تا ۷ روز کاردیومیوسیتها به صورت اجسام تپنده شکل گرفتند .

آنالیز ضربان

در روزهای ۱۲ و ۱۴ پس از شروع آزمایشات تمایز تعداد اجسام جنینی ضربان دار به کمک میکروسکپ فاز کنتراست شمرده شد. برای ارزیابی فرکانس ضربان تعداد ضربان‌ها در دقیقه محاسبه شد. این آزمایش ۳ بار تکرار شدو نتایج با ذکر انحراف از میانگین ارائه شد. آزمایش real Time PCR از روش real Time PCR برای ارزیابی بیان ژن PEP و نشانگرهای ژنی ویژه قلبی استفاده شد. به منظور جداسازی RNA از کیت RNeasy Mini Kit (Qiagen)استفاده گردید. قبل از انجام نسخه برداری، جهت حذف آلودگی به DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با DNaseI(Fermentas) به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شدند. آنگاه نمونه‌ها با EDTA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا DNase غیرفعال گردد. برای سنتز cDNA از ترانس کریپتاز معکوس MMLV (Fermentas)، هگزامرهای تصادفی و ۱ میکروگرم از نمونه RNA استفاده شد. مخلوط واکنش جهت انجام realTimePCRشامل ۲۵ نانوگرم از نمونه cDNA، ۱۰میکرولیتر Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix ((Qiagen و ۳,۰ μMاز هر جفت پرایمرها

2. Three germ layers
3. In vitro
4. Hanging drop method

Archive of SID
www.SID.ir

بود. واکنش real Time PCR در دستگاهThermal Cycler Rotor gene ۶۰۰۰(Corbett) انجام شد. بیان ژن‌های هدف(جدول شماره ۱) با سطح بیان ژن گلیسر آلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز[4] نسبت داده شدند. ضمنا تمام محاسبات ۳ بار تکرار شده و داده‌ها با روش CtΔΔ محاسبه گردیدند. پرایمرهای ژن‌های هدف با نرم افزار Beacon designer (Version 7.2, USA) طراحی شدند و به شرکت Metabion آلمان سفارش داده شد(جدول شماره ۲). محاسبه آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS (version16) انجام شد و میانگین و انحراف از معیار برای تمام گروهها به دست آمد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون آماری t- test و آزمون t دو نمونه ای مستقل بر اساس سطح معنا داری$P< 0.05$ انجام شد.

نتایج:

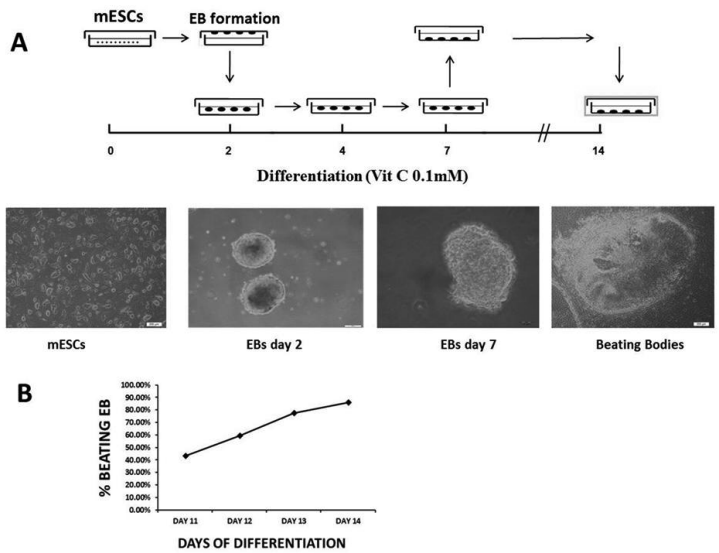
پروسه تمایز قلبی چنانکه در قسمت قبلی عنوان گردید در سلول‌های بنیادی جنین موش در ۴ مرحله مشتمل بر سلول بنیادی جنینی موش، اجسام جنینی روز ۲ ، اجسام جنینی روز ۷ و کاردیومیوسیت‌های بالغ (اجسام تپنده) بررسی گردید (شکل شماره۱A). نتایج نشانگر آن

جدول شماره ۱ : ژن‌های نشانگرویژه هر یک از مراحل تمایز قلبی ازرده‌های مختلف سلولی بررسی شده

نام ژن	رده‌های مختلف سلولی
Rex1, Nanog	سلولهای بنیادی
Brachyury	سلولهای مزودرمی
Gata4, Nkx2.5	سلولهای پیش ساز قلبی
αMHC	سلولهای بالغ قلبی

جدول شماره ۲ : پرایمرهای استفاده شده جهت آنالیز بیان ژن‌های هدف توسط real-time PCR

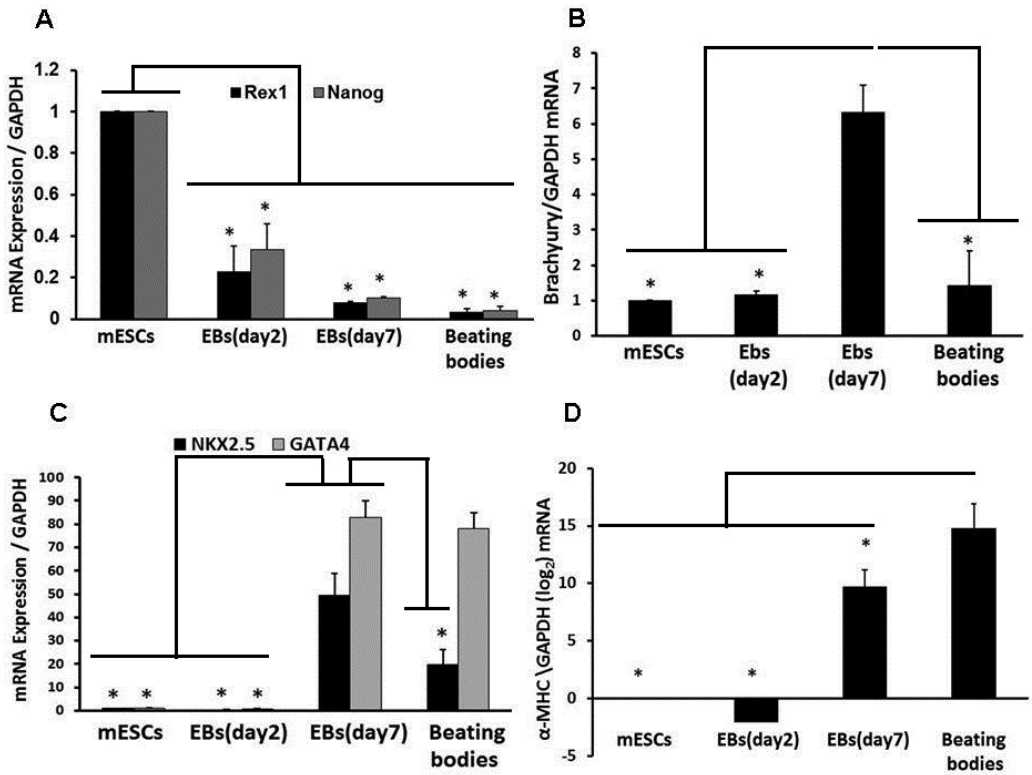
Gene	Forward Primer (5′-3′)	Reveres Primer (5′-3′)	AT	Accession No
PEP	GACAGTAGAGAATGCGAGAGG	CCGATGATATGAGAAGATGGAG	60	*NM_027402.2*
GAPDH	TGCCGCCTGGAGAAACC	TGAAGTCGCAGGAGACAACC	60	*NM_008084.2*
Rex1	CCAGTCCAGAATACCAGAGT	AGCCATCTTCCTCAGTCT	58	NM_009556.3
Nanog	TGAGCTATAAGCAGGTTAAGAC	CAATGGATGCTGGGATACTC	55	NM_028016.2
Brachyury	GCTCATCGGAACAGCTCTCC	GGAGAACCAGAAGACGAGGA	55	NM-009309.2
Nkx.5	TTAGGAGAAGGGCGATGA	AGGGTGGGTGTGAAATCTG	5	NM-008700.2
Gata4	GGAGAAGGGCGATGCCA	TGGGTGTGAAATCCCTAT	60	NM-005202.2
a MHC	CAGAGGAGAAGGCTGGTGTC	CGAACATGTGGTGGTTGAAG	58	NM_001164171.2



شکل شماره۱ : (A) مراحل تمایز قلبی و مورفولوژی سلولهادر ۴ مرحله: سلول بنیادی، اجسام جنینی دو روزه ، اجسام جنینی هفت روزه و کاردیومیوسیت‌های بالغ (B) آنالیز ضربان اجسام جنینی: تعداد اجسام تپنده جنینی از روز یازدهم تا چهاردهم نمایش داده شده است.

4. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

www.SID.ir



شکل شماره۲: الگوی بیان ژنی در طی روند تمایز به سلولهای قلبی. آنالیز بیان ژن‌های Rex۱ و Nanog (ژن‌های نشانگر سلول بنیادی)، Brachyury (ژن نشانگر سلول مزودرمی) ، Nkx۲,۵ و Gata۴ (ژن‌های مشانگر سلول پیش ساز قلبی) و MHC (ژن نشانگر سلول قلبی بالغ).

بود که پس از ۷ روز القا توسط آسکوربیک اسید ، اجسام شبه جنینی به طور موثر به کاردیومیوسیت‌های تک هسته ای با ضربان موزون تمایز یافته اند و در ادامه کلونی‌های پراکنده با ضربان خودبخودی، بسط یافته و کاردیومیوسیت‌هایی با چندین ناحیه ی ضربان دار را در روز ۱۴ ایجاد کرده‌اند. مرفولوژی این سلولها در شکل شماره۱A نمایش داده شده است. در این مطالعه، حدود ۸۰٪ از اجسام جنینی به کاردیومیوسیت تمایز یافتند که این امربا شمارش تعداد اجسام تپنده نیز تایید شد(شکل شماره۱B). بدین نحو که از روز یازدهم تا چهاردهم تعداد این اجسام افزایش دو برابری را نشان میداد. بیان ژنهای ویژه ی هر مرحله ی تمایزی نیز با تکنیک real Time PCR سنجیده شد. با توجه به شکل ۲A بیان ژن‌های Nanog و Rex1 در طی پروسه تمایز کاهش یافت که نشان دهنده تمایز سلولهای بنیادی جنینی در این روند بود(شکل شماره۲A). همچنین بیان ژن Bruchyury الگوی دینامیکی خاصی را نشان می‌داد بدان معنا که این ژن در سلولهای بنیادی جنینی و اجسام جنینی روز ۲ بیان چندانی نداشت، درحالیکه دراجسام جنینی روز ۷ به حداکثر بیان خود رسیده و در کاردیومیوسیت‌های بالغ بیان این ژن کاهش می‌یافت(شکل شماره۲B). بیان ژن‌های Gata4 و Nkx2.5 در اجسام جنینی روز ۷ به حداکثر بیان خود رسیده و در کاردیومیوسیت‌های بالغ اندکی کاهش می‌یافت(شکل شماره۲C). ضمنا بیان ژن پروتئین ویژه ی کاردیومیوسیت‌های ضربان دار (α-MHC) در اجسام جنینی روز ۷ بیان شده و در کاردیومیوسیت‌ها به حداکثر بیان خود رسید (شکل شماره۲D). در مجموع نتایج نشانگر روند تمایزی سلولهای بنیادی به قلبی و گذر از مرحله پیش ساز سلولهای قلبی بود. در این فرایند الگوی بیانی ژن PEP به طور فزاینده ای در سلولهای کاردیومیوسیتهای بالغ افزایش یافت(شکل شماره ۳).

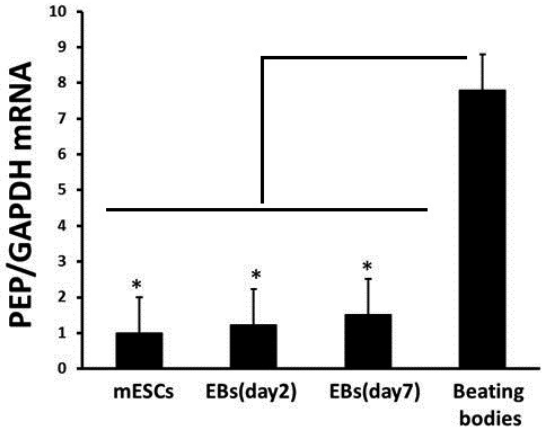
بحث:

ژن PEP کد کننده ۲۰۹ اسید آمینه است که cDNA آن در سال ۲۰۰۲ توسط فرر مارتینز کلون شد و نشان داده شد که در موش بالغ

Archive

www.SID.ir

بیان آن در بافتهایی نظیر قلب، ماهیچههای اسکلتی و مغز بالا بوده است (۱). مطالعات اولیه گروه پژوهشی ما نشان داد که بدنبال تمایز سلولهای بنیادی موشی تحت القای رتینوئیک اسید به سلولهای عصبی، این ژن الگوی بیانی افزایشی را نشـان میداد (۷).در طی مطالعات زمینه ای بیشتر توسط اعضای گروه ما با بکارگیری سازه بیانی shRNA اختصاصی بر علیه ژن PEP که قابل القا به توسـط داکسـی سیکلین بود نشـان داده شد که سرکوب این ژن در طی مراحل مختلف تمایز عصبی میتواند موجب کاهش میزان تمایز این سـلولهای به سلولهای عصبی گردد (۸). در مطالعه حاضر به عنوان اولین قدم جهت بررسی عملکرد این ژن در طی فرایند تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای قلبی، و بدلیل عدم مطالعات مشابه در این زمینه، پروفایل بیان این ژن در پروسه کاردیوژنز موش بررسـی قرار گرفت. نتایج بیانگر آن بود که بیان این ژن در کاردیومیوسیتها آشکارا افزایش مییابد. همانطور که بیان این ژن در بافت قلب موش بالغ به حداکثر بیان خود میرسد و در مسیر تمایز ماهیچه اسکلتی و تشکیل میوتیوبها در جنین موش نیز افزایش مییابد(۱). این نتایج پیشنهاد کننده ی نقش احتمالی این



شکل شماره ۳: الگوی بیان ژن PEP طی روند تمایز به سلولهای قلبی

ژن در مراحل انتهایی کاردیوژنز میباشد. با آگاهی از این مطلب که کار آمدی القای تمایز قلبی توسط آسکوربیک اسید افزایش میابد (۹). با توجه به تجمع اجسـام جنینی و حضور آسکوربیک اسید، در این مطالعه اهمیت وجود آسکوربیک اسید و تجمع اجسام جنینی بر بیان ژن PEP از مواردی است که نیازمند به مطالعات بیشتر است .

منابع/ References

1. Ferrer-Martinez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR. Mouse PeP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. Dev Dyn. 2002; 224: 154- 167.
2. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-likedevelopment of white fat and thermogenesis. Nature.b2012; 481:463-8.
3. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. Metabolism. 2012; 61(12):1725-38.
4. Lecker SH, Zavin A, Cao P, et al. Expression of the Irisin precursor FNDC5 in skeletal muscle correlates with aerobic exercise performance in patients with heart failure. Circ Heart Fail. 2012; 5(6): 812-8.
5. Stavridis MP, Smith AG. Neural differentiation of mouse embryonic stem cell. Biochem Soc Trans. 2003; 31: 45-49.
6. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol.2005; 38: 494-503.
7. Ostadsharif M, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH, et al. The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation. Differentiation. 2011; 81(2):127-32.
8. Hashemi MS, Ghaedi K, Salamian A, et al. Fndc5 knockdown significantly decreased neural differentiation rate of mouse embryonic stem cells. Neuroscience. 2013 [in press].
9. Pucéat M. Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells.Methods. 2008; 45(2):168-71.

Archive of SID

www.SID.ir