

کاهش بیان پروتئین های میتوکندریایی در پروتئوم سیستم عصبی مرکزی مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس

سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی^۱، M.D.^{۲،۳}، محمد حسین صنعتی Ph.D.^{۳*}، داود نصرآبادی M.Sc.^۱،
علیرضا پویا M.Sc.^۱، حسین بهاروند Ph.D.^۴، سید قاسم حسینی سالکده Ph.D.^{۵*}

۱. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات تولیدمثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران
۳. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
۴. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
۵. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه فیزیولوژی پروتئومیکس، کرج، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول:

ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی

پست الکترونیک: [Email: salekdeh@royaninstitute.org](mailto:salekdeh@royaninstitute.org)

ایران، تهران، صندوق پستی: ۶۳۴۳-۱۴۱۵۵، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی

پست الکترونیک: [Email: m-sanati@nigeb.ac.ir](mailto:m-sanati@nigeb.ac.ir)

دریافت مقاله: ۸۸/۱/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۳۰

مکیده

* **هدف:** شناسایی آسیب‌های مولکولی وارده بر سیستم عصبی مرکزی مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس
* **مواد و روش‌ها:** مدل موشی انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) به وسیله ماده گلایکوپروتئین الیگوپروتئین الیگو دندروسیت میلین القا گردید. پروفایل‌های بیانی پروتئین‌های سیستم عصبی مرکزی موارد سالم و نمره بالینی ۱ و ۳ مدل EAE با استفاده از روش پروتئومیکس مبتنی بر الکتروفورز دو بعدی به همراه اسپکترومتری جرمی از نوع MALDI TOF/TOF مطالعه گردید.
* **یافته‌ها:** هشت پروتئین میتوکندریایی را که به صورت متفاوت در سیستم عصبی مرکزی بیان شده بودند، شناسایی شد که همه آنها در نمره بالینی ۱ و ۳ یا هر دو، کاهش بیان را نشان دادند. از بین آنها ۵ پروتئین متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندری بودند که عبارت از: NADH دهیدروژناز (بویکینون) Fe-s پروتئین ۸، سیتوکروم c اکسیداز Va، سیتوکروم c اکسیداز Vb، ATP5B و NADH دهیدروژناز فلاووپروتئین ۲ بودند. همچنین کاهش بیان ۳ پروتئین میتوکندریایی دیگر از جمله: گلوکوتاروکسین ۵، استرادیول ۱۷ بتا دهیدروژناز ۸ و ایزوسیترات دهیدروژناز مشاهده گردید.
* **نتیجه‌گیری:** کاهش بیان پروتئین‌های میتوکندریایی، این فرضیه را تقویت می‌بخشد که آسیب‌های شبه هیپوکسی در بافت آسیب دیده مالتیپل اسکلروزیس ممکن است به دلیل اختلالات میتوکندریایی باشد.

* **کلیدواژگان:** میتوکندری، پروتئومیکس، انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی، مالتیپل اسکلروزیس

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۲۴۳-۲۳۶

مقدمه

تحقیقات مولکولی گسترده‌ای بر روی مدل حیوانی EAE برای شناخت بهتر مکانیسم بیماری صورت گرفته است (۹-۱۱). ابراهیم و همکاران با استفاده از راهکار میکرواری پروفایل ژنی مدل EAE و کنترل را بررسی نمودند که از تعداد ۱۱۰۰۰ ژن بررسی شده، ۲۱۳ ژن تغییر بیان نشان دادند (۱۲).

لاک و همکاران روی نمونه مغز ۴ بیمار مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis; MS) بعد از مرگ با روش میکرواری کار کردند. در مقایسه تغییر بیان ژن‌ها بین نمونه بیمار و کنترل متوجه شدند که ژن‌های پاسخ سیستم ایمنی شامل MHC CLASS II و ایمونوگلوبولین G افزایش بیان دارند، در حالی که ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با میلین کاهش بیان داشتند (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات بیان در سطح mRNA معادل

بیماری مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی نورودژنراتیو و اتوایمیون سیستم عصبی مرکزی با مشخصات بارز التهاب، تخریب میلین، آسیب آکسون‌ها و گلیوز است؛ اگر چه پاتوژنز و مکانیسم این بیماری هنوز به طور کامل شناخته نشده است (۴-۱). در بسیاری از مطالعات برای شناخت بهتر یکی از راهکارهای مهم مطالعه این بیماری استفاده از مدل حیوانی است. بهترین مدل حیوانی که به شکل مزمن بروز می‌کند، مدل انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE) است که با استفاده از پروتئین گلایکوپروتئین الیگو دندروسیت میلین (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein; MOG) در حیوان القا می‌گردد (۸-۵).

جدول ۱: تعریف نمره بالینی مدل EAE

نمره بالینی	علائم بالینی
۰	نرمال
۱	فلج دم
۲	پارزی یا بی‌حسی اندام‌های عقبی
۳	فلج اندام‌های عقبی
۴	فلج چهار اندام
۵	مرگ

پس از کشتن موش‌ها، مغز و نخاع آنها بلافاصله استخراج و با نرمال سالین شست‌وشو داده و به دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از مغز و نخاع بر اساس روش بهاروند و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (۲۱). ابتدا کل نمونه‌های مغز و نخاع که در سه گروه نمره بالینی ۱، نمره بالینی ۳ و کنترل به صورت جداگانه و در سه تکرار نمونه‌برداری شده بودند، در بافر لیزکننده به خوبی و با استفاده از ورتکس و دستگاه سونیکاتور سوسپانسیون شدند. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی برداشت شده و ۸ میلی‌لیتر محلول سرد TCA/acetone ۱۰ درصد وزن به حجم به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، جهت رسوب دادن پروتئین قرار گرفت. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. در این مرحله مایع رویی دور ریخته شده و پلت حاوی پروتئین در محلول DTT/acetone ۰/۰۷ درصد وزن به حجم (محلول شست‌وشوی نمونه) به حالت سوسپانسیون درآمد و مدت ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، جهت رسوب بهتر پروتئین‌ها قرار گرفت. سپس محلول نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. این مرحله یک بار دیگر جهت برطرف نمودن آلودگی‌های غیرپروتئینی موجود در پلت تکرار، در نهایت پس از دو بار شست‌وشو لیوفیلایز گردید تا استون موجود در آن حذف شود.

استخراج نمونه پروتئین‌ها از پلت با استفاده از بافر هضم‌کننده (7M urea, 2M thiourea, 20 mM DTT, 4% CHAPS, 2mM EDTA, 1 Tablet protease inhibitor cocktail for, 40mM Tris Base, 2% ampholite, 1mM PMSF 50 ml lysis buffer)

پروتئین صورت گرفت. بدین منظور به پلت لیوفیلایز شده ۵۰۰ میکرولیتر از محلول هضم‌کننده افزوده شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در طول این مدت به تناوب هر ۵ دقیقه تیوب اپندورف حاوی نمونه ورتکس شده تا استخراج به نحو مطلوب‌تری صورت گیرد. سپس سوسپانسیون حاصله با استفاده از سانتریفیوژ رومیزی در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ و محلول رویی که حاوی پروتئین استخراج شده بود، برداشته شد.

تغییرات در سطح پروتئین نیست (۱۴). بنابراین با توجه به اهمیت پروتئین در عملکرد سلول‌ها، برای شناخت و بررسی بهتر می‌توان به بررسی تغییرات در سطح پروتئین پرداخت. امروزه با پیشرفت‌های صورت گرفته در فناوری‌های پروتئومیکس، می‌توان به شناسایی بیومارکرها و نیز نقشه پروتئین‌ها در بیماری‌های مختلف دست یافت (۱۵، ۱۶).

از جمله این فناوری‌ها می‌توان به ترکیبی از الکتروفورز دو بعدی و اسپکترومتری جرمی اشاره نمود که کمک می‌کند تغییر بیان پروتئین‌ها را در حالات مختلف به دست آید. با کمک راهکار پروتئومیک و شناسایی پروتئین‌های سیستم عصبی مرکزی می‌توان رخدادهای پاتوفیزیولوژیک در اختلالات سیستم عصبی مرکزی را مورد مطالعه قرار داد (۱۷).

در مطالعه پروتئومیکس نخاع کم‌ری EAE، ۲۰ پروتئین جدید که در اثر بیماری تغییر بیان پیدا کرده بودند، شناسایی شدند. این پروتئین‌ها در التهاب، حفظ و آسیب سیستم عصبی، Cytoskeletal Integrity و سنتز پروتئین نقش دارند (۱۱).

در مطالعات متعددی به نقص‌های میتوکندریایی در مالتیپل اسکلروزیس و EAE اشاره شده است (۲۰-۱۸).

هدف از مطالعه، بررسی تغییرات پروتئینی سیستم عصبی مرکزی مدل موشی EAE (c57BL/6) در زمان شروع و مرحله حاد بیماری در مقایسه با گروه کنترل بوده است. با توجه به اهمیت میتوکندری در بیماری MS، تمرکز اصلی مطالعه بر روی پروتئین‌ها و تغییرات آن بوده تا آسیب‌های وارده به میتوکندری در مدل حیوانی بیماری MS بهتر شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها

القا مدل حیوانی EAE

موش‌های ماده ۶ هفته‌ای c57BL/6 که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بودند تحت شرایط دمای 1 ± 22 درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و در ۸ هفتهگی به سه گروه تقسیم شدند.

گروه اول: به ازای هر موش پپتید ۳۵-۵۵ MOG به میزان ۴۰۰ میکروگرم در حجم ۱۰۰ میکرولیتر محلول فسفات بافر که با حجم ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر امولسیفیه شد. سپس در دو فلانک موش ۲۰۰ میکرولیتر زیر جلدی تزریق و در دو نوبت روزهای ۰ و ۲ به میزان ۵۰۰ نانوگرم سم پرتوزیس در حجم ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر داخل پریتون تزریق گردید. موش‌های این گروه در مرحله شروع علائم یا نمره بالینی ۱ با گاز CO_2 کشته شدند.

موش‌های گروه دوم: مدل‌سازی این گروه مانند گروه اول بوده ولی موش‌های این گروه در مرحله حاد یا نمره بالینی ۳ با گاز CO_2 کشته شدند.

گروه سوم: همان گروه کنترل بود که فقط ادجوانت فروند کامل را به میزان ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در هر دو فلانک زیرجلدی دریافت کردند. موش‌های این گروه هم‌زمان با گروه نمره بالینی ۳ با گاز CO_2 کشته شدند.

موش‌ها توسط شخصی که از تقسیم‌بندی آنها آگاه نبود، روزانه یک نوبت وزن و تعیین نمره بالینی می‌شدند؛ نمره بالینی بر اساس این معیار در جدول ۱ ارائه گردیده است.

الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل‌ها بعد اول:

از ژل‌های نواری ۲۴ سانتی‌متری (pH=۴-۷) Biorad استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا ۲۵۰ میکروگرم از پروتئین استخراج شده در محلول Rehydration (Urea 8M, CHAPS 2% W/W, Bromophenol (Blue a few grain, IPG Buffer 0.5%) حل شد و سپس ژل‌های نواری در داخل سینی‌های مخصوص باز جذب ژل‌های رشته‌ای در طول شب با این محلول تیمار شدند. سپس ژل‌ها به دستگاه Protein IEF Cell منتقل و الکتروفورز با برنامه (۲۵۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ۲۵۰ ولت به مدت ۱ ساعت، ۳۵۰۰ ولت به مدت ۳/۵ ساعت و ۳۵۰۰ ولت به میزان ۸۰۰۰۰ ولت ساعت) اجرا شد.

بعد دوم:

پس از اتمام بعد اول، ژل‌های نواری به مدت ۱۵ دقیقه تحت تاثیر محلول متعادل کننده (6 M urea, 30% (w/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8. 1%, (w/v) DTT) قرار گرفته و برای انجام بعد دوم به روی ژل‌های SDS-PAGE ۱۲ درصد منتقل شدند. از محلول آگارز ۰/۵ درصد وزن به حجم جهت اتصال دو ژل استفاده شد و با استفاده از تانک الکتروفورز عمودی (PROTEIN II, Bio-Rad)، بعد دوم با برنامه ۱/۵ وات برای هر ژل انجام شد. آشکارسازی نقاط پروتئینی بر روی ژل‌ها با استفاده از نیترات نقره صورت گرفت. با اتمام بعد دوم، ژل‌ها از روی شیشه‌ها جدا شده و به مدت یک ساعت به سینی‌های مخصوص رنگ‌آمیزی حاوی محلول ثابت کننده (Fixative Solution) منتقل شدند. پس از این مرحله ژل‌ها دو بار با اتانول ۳۰ درصد و دو بار با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه شست‌وشو شدند. پس از انجام شست‌وشو، ژل‌ها جهت آماده شدن برای رنگ‌آمیزی با نیترات نقره به مدت ۱ دقیقه در محلول حساس کننده قرار داده سپس سه بار به مدت ۳۰ ثانیه با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. پس از شست‌وشوی آخر، محلول نیترات نقره ۰/۲ درصد به روی ژل‌ها ریخته شده و عمل رنگ‌آمیزی به مدت حداقل ۳۰ دقیقه ادامه یافت. سپس محلول نیترات نقره از محیط حذف و ژل‌ها سه بار هر بار به مدت ۳۰ ثانیه با آب مقطر شسته شدند. پس از این مرحله جهت آشکارسازی نقاط روی ژل‌ها از محلول ظهور (۳ درصد Sodium Carbonate، ۰/۰۵ Formaldehyde (۳۷ درصد)، ۰/۰۰۵ درصد Sodium Thiosulfate) به مدت ۱۵-۸ دقیقه استفاده و در نهایت با استفاده محلول متوقف کننده آشکارساز نقاط ۵ درصد (Glycin) متوقف، ژل‌ها ۳ بار با آب مقطر شسته شد. آنالیز ژل‌ها بر اساس روش نصرآبادی و همکاران صورت گرفت (۲۲).

اکتساب تصاویر، آنالیز ژل‌ها و شناسایی نقاط با Mass Spectrometry (MS)

ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با استفاده از دنسیتومتر GS-800 (Bio-Rad) و با وضوح ۶۰۰ نقطه در اینچ اسکن شده و تصاویر

مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Image master 2D Platinum (GE Healthcare)، آنالیز شدند.

پس از آنالیز آماری داده‌های حاصل از ژل‌های دو بعدی، نقاطی که بیان آنها بر اساس القای مدل بیماری حداقل دو برابر تغییر معنی‌دار (کاهش یا افزایش) داشتند از روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ کوماسی برلیانت‌بلو که با طیف سنجی جرمی سازگار است جدا شدند. سپس نقاط پروتئینی در دانشگاه یورک انگلستان و با استفاده از دستگاه اسپکترومتری (Bruker MALDI Tof/Tof ultraflex III) آنالیز و شناسایی شدند.

یافته‌ها

بررسی تغییرات الگوی پروتئوم مغز و نخاع

پس از اکتساب تصاویر ژل‌ها با دنسیتومتر و ورود آنها به نرم‌افزار Image master 2D Platinum (GE Healthcare)، روی ژل‌های مغز حداقل ۱۵۰۰ نقطه شناسایی شد. از بین این نقاط ۶۸۰ نقطه به کمک نرم‌افزار و با تایید چشم تکرارپذیر تشخیص داده شد و بر روی این نقاط، آنالیزهای آماری نظیر t test با استفاده از نرم‌افزار مذکور انجام گرفت.

پس از آنالیز این نقاط، ۷۰ نقطه بیش از دو برابر تغییر معنی‌دار در بیان خود، حداقل در یکی از دو مرحله نشان دادند. از بین این نقاط تنها ۶۳ نقطه در روی ژل‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ کوماسی برلیانت‌بلو قابل مشاهده بودند. این پروتئین‌ها جدا گشته و برای شناسایی با طیف سنجی جرمی ارسال گردید که در نهایت دستگاه طیف سنجی جرمی موفق به شناسایی ۴۸ پروتئین در مغز شد.

روی ژل‌های نخاع حداقل ۲۰۰۰ نقطه قابل شناسایی بود. از بین این نقاط ۷۶۰ نقطه به کمک نرم‌افزار و با تایید چشم تکرارپذیر تشخیص داده شد و آزمون‌های آماری روی این نقاط انجام شد. از بین پروتئین‌هایی که در EAE بیان آنها بیش از دو برابر تغییر یافته بود، ۲۳ نقطه به کمک طیف سنجی جرمی در نخاع شناسایی شد.

بررسی محل فعالیت پروتئین‌های شناسایی شده

تعیین محل فعالیت یک پروتئین در سلول علاوه بر این که می‌تواند ایده‌ای در مورد ساختار پروتئین ترسیم کند، در حدی می‌تواند در پیش‌بینی نوع پروتئین‌های بیولوژیک که یک پروتئین در آن به ایفای نقش می‌پردازد، حایز اهمیت باشد. به هنگام بررسی تاثیر یک بیماری بر مجموعه پروتئوم سلولی یک بافت، محل استقرار پروتئین‌های درگیر می‌تواند در پیش‌بینی مکانیزم‌های بیماری‌زایی موثر باشد.

جستجو در بانک‌های اطلاعاتی نظیر

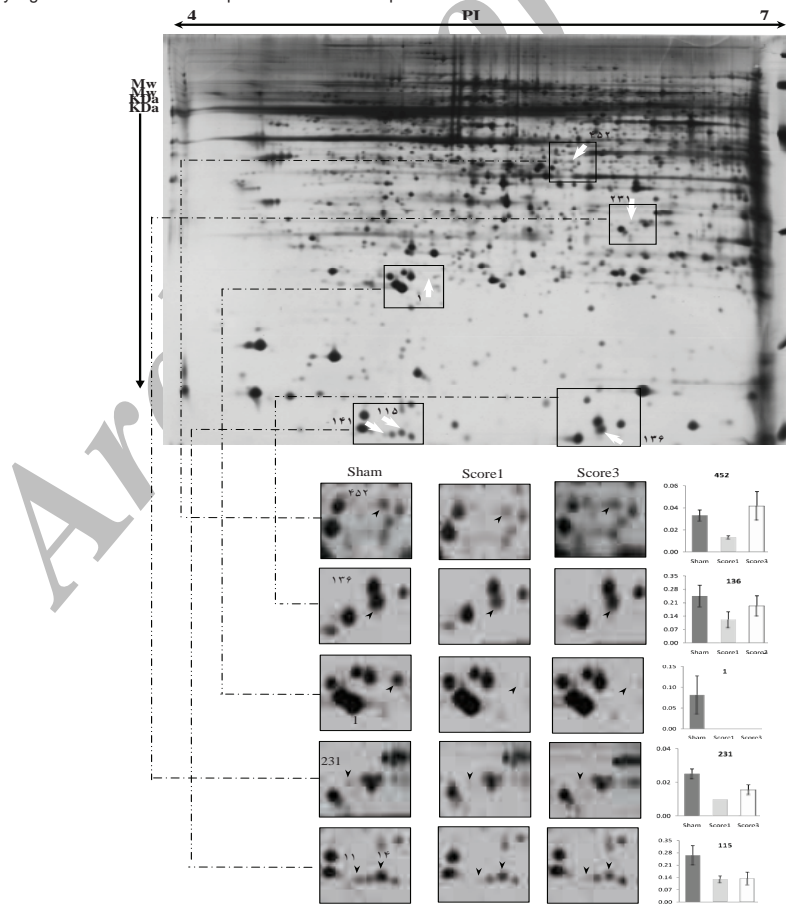
European Bioinformatic Institute EBI (www.ebi.ac.uk) نشان داد که از بین ۴۸ پروتئین پاسخ‌دهنده در مغز ۶ پروتئین به شماره‌های ۱۱۵، ۱۳۶، ۱۴۳، ۲۳۱ و ۴۵۲ در میتوکندری قرار دارند (شکل ۱).

در نخاع نیز دو پروتئین پاسخ‌دهنده به شماره‌های ۲۶ و ۸۹ در میتوکندری قرار دارند (شکل ۲). بررسی میزان بیان این پروتئین‌ها نشان می‌دهد که بیان پروتئین‌های پاسخ‌دهنده میتوکندریایی سیستم عصب مرکزی با شروع یا پیشرفت علائم بیماری کاهش نشان دادند (جدول ۲).

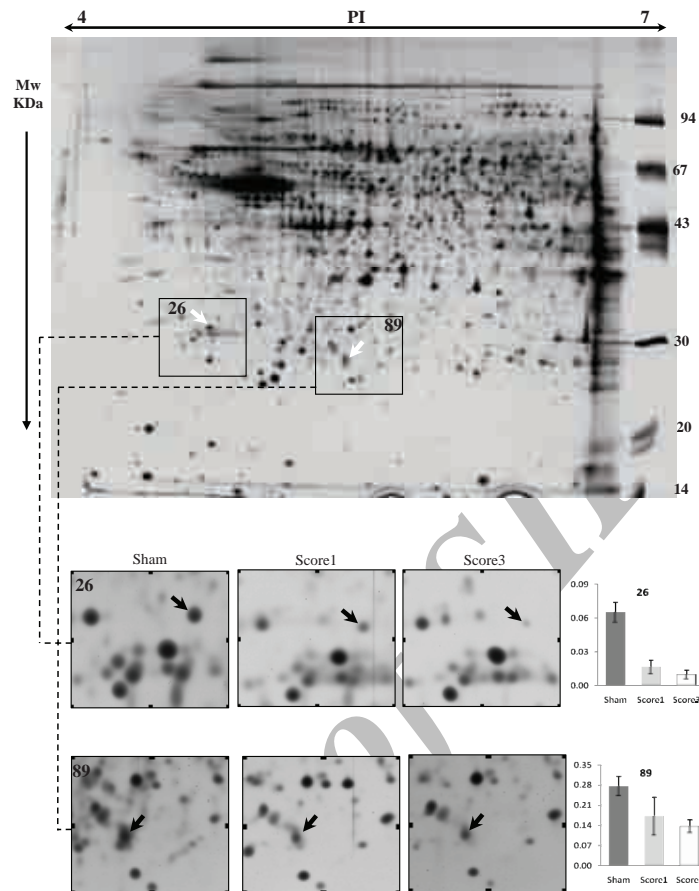
جدول ۲: نتایج طیف سنجی جرمی پروتئین‌های میتوکندریایی مغز و نخاع که به روش MALDI TOF/TOF شناسایی شدند. نقاط شناسایی شده حداقل دو برابر تغییر در بیان خود در یکی از دو گروه شروع و یا پیشرفت علائم داشتند.

Mass spectrometry results of proteins expressed using MALDI TOF/TOF									
Spot ID ^a	Theo. ^b Pi/Mw	Exp. ^c Pi/Mw	Accession No. ^d	Gene symbol	Protein name	.Cov% /Score	MS/MS MS f-	Expression level g	
								Score1/ Sham	Score3/ Sham
۱	۵/۵/۲۷	۵/۹/۲۲	۴۶۱۹۵۳۳۰	Ndufs 8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein8	۳۳/۲۳۱	۱۰/۵	ND*	ND**
۱۱۵	۵/۱۲	۵/۳/۱۵	۱۹۴۲۹۹۰	Cox5a	Cytochrome C Oxidase Va	۲۲/۱۰۸	۳/۱	-۲/۰۶**	-۱/۹۹**
۱۳۶	۶/۵/۱۱	۶/۴/۱۵	۲۲۳۵۹۰	COX5B	Cytochrome C Oxidase Vb	۳۰/۱۱۱	۲/۱	-۲/۰۴**	-۱/۲۷
۱۴۳	۶/۱/۱۶	۵/۱/۱۴	۲۱۳۱۲۱۵۳	Glx5	glutaredoxin 5	۲۱/۱۱۳	۲/۲	-۴/۶۳**	-۲/۸۳**
۲۳۱	۱۰/۲/۲۵	۶/۶/۳۳	۱۴۸۶۷۸۲۹۵	H2-Ke6	H2-K region expressed gene 6	۳۴/۲۳۴	۷/۴	-۲/۵۶**	-۱/۶۰
۴۵۲	۵/۸/۳۵	۶/۲/۴۱	۱۴۸۶۹۳۸۷۵	ldh3a	Isocitrate dehydrogenase	۲۷/۹۳	۹/۲	-۲/۵۳**	۱/۲۶
۲۶	۴/۴/۲۵	۴/۹/۳۲	۳۲۱۸۹۳۹۴	ATP5B	ATP synthase,H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta	۵۵/۸۰	۶/۱	-۳/۹۹**	-۶/۶۷**
۸۹	۷/۵/۲۱/۵	۵/۷/۲۸	۲۶۳۵۳۱۴۲	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein2	۴۲/۲۴۲	۴/۴	-۱/۶۲**	-۲/۰۳**

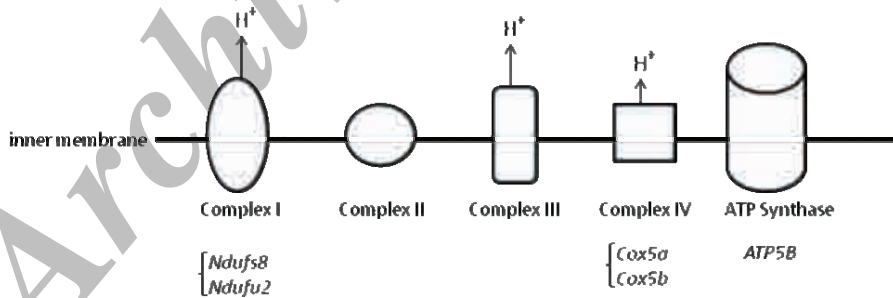
a The numbering corresponds to the 2D gel in Figure 1 & 2; b Experimental pI and MW; c Theoretical pI and MW; d Accession number in NCBI; e Mascot score and percent coverage resulted from combined MS-MS/MS search; f Number of peptide identified by PMF and MS/MS; g Fold change in expression (percent volume of Score1 & 3/percent volume of Sham), ND: protein was not detected in Score 1 or 3; * Change statistically significant in Score 1 or 3 compared to Sham when $p < 0.05$; ** Change statistically significant in Score 1 & 3 compared to Sham when $p < 0.01$.



شکل ۱: تصویر ژل دو بعدی مغز موش. در بعد اول ۲۵۰ میکروگرم پروتئین از هر نمونه روی ژل‌های نواری لود شد و برای بعد دوم از SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده گردید. رنگ آمیزی نیترات نقره برای ظاهر سازی نقاط به کار رفت. نقاط اشاره شده مجموعه پروتئین‌های میتوکندریایی مغز را نشان می‌دهد که بیان آنها در پاسخ به بیماری تغییر یافته است.



شکل ۲: تصویر ژل دو بعدی نخاع موش. بیان دو پروتئین ۲۶ و ۸۹ در پاسخ به روند پیشرفت بیماری کاهش پیدا نموده است.



شکل ۳: تصویر شماتیک زنجیره تنفسی میتوکندری و کمپلکس های پروتئینی آن. برخی از پروتئین های پاسخ دهنده در مدل EAE این مطالعه به کمپلکس های این زنجیره تعلق دارند.

(IV) و کمپلکس V است که به طور مستقیم در سنتز ATP دخالت دارد (شکل ۳).

کمپلکس های زنجیره تنفسی میتوکندری از زیر واحدهای متعددی تشکیل شده که توسط DNA هسته و DNA میتوکندری کد می شوند. پروتئین های کمپلکس II به طور کامل به وسیله DNA هسته کد می گردند (۲۳).

نقطه شماره ۱ در ژل های مغز فقط در گروه کنترل دیده شده و با استفاده از اسپکترومتری جرمی این نقطه به عنوان NADH دهیدروژناز

بحث

در این مطالعه، پروتئوم سیستم عصبی مرکزی مدل EAE را با گروه کنترل مقایسه کردیم. پروتئین هایی را که بیان آنها تفاوت معنی داری بین گروه کنترل، نمره بالینی ۱ و ۳ پیدا نموده بودند با کمک اسپکترومتری جرمی شناسایی نمودیم. از میان آنها، ۸ پروتئین در میتوکندری قرار داشتند که ۵ پروتئین مربوط به چرخه تنفسی میتوکندری می باشد. چرخه تنفسی میتوکندریایی در غشا داخلی میتوکندری قرار گرفته و شامل چهار کمپلکس (کمپلکس های I تا

ATP در آن تولید و نقش مهمی در آپوپتوز و هموستاز کلسیم ایفا می‌کند (۲۴).

اختلال عملکرد زنجیره تنفسی میتوکندریایی در بیماری‌های نورولوژیک مانند: آلزایمر، پارکینسون و MS گزارش گردیده است (۱۹، ۳۲).

شبهات‌های علائم بالینی در اختلالات میتوکندریایی با بیماری MS (خستگی، اختلال بینایی، سردرد، کاهش شنوایی، تشنج، آتاکسی و فراموشی) دلیلی بر ارتباط نزدیک اختلالات میتوکندریایی با بیماری MS بیش از آن چیزی است که شانس به حساب آید (۳۳، ۳۴).

مطالعه بر روی EAE نشان داده که تغییرات مولکولی مسیر داخلی شامل: نیتراسیون و استرس اکسیداتیو پروتئین‌های میتوکندریایی قبل از بروز التهاب و تخریب میلین رخ می‌دهد (۳۵).

کاهش بیان پروتئین‌های میتوکندری این فرضیه را تقویت می‌بخشد که آسیب‌های ایجاد شده شبیه به وضعیت کاهش اکسیژن در بافت سیستم عصبی مرکزی بیمار مالتیپل اسکلروز در اثر اختلالات میتوکندری به وجود می‌آید.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های به عمل آمده و نقش آن در بیماری MS، فرضیه‌های زیر استنتاج می‌گردد:

۱. کاهش بیان پروتئین‌های مهم زنجیره تنفسی، عامل اولیه است و نتیجه آن می‌تواند تخریب میلین باشد؛ چون ساختمان میلین برای نگهداری نیاز به ATP دارد.

۲. کاهش بیان پروتئین‌ها نه به دلیل فیدبک کاهش نیاز به انرژی درون سلولی بلکه در نتیجه غیر فعال شدن مسیرهای مولکولی خاصی است که در نتیجه تخریب میلین و ایجاد EAE به وجود می‌آید.

۳. کاهش بیان پروتئین‌های کمپلکس I ممکن است به طور مستقیم ارتباطی با تخریب میلین نداشته بلکه از طریق فعال یا غیر فعال کردن مسیرهای مولکولی آنبشار دیگری عامل ایجاد تخریب میلین باشد.

۴. کاهش بیان پروتئین‌های کمپلکس I ممکن است با تخریب میلین ارتباط نداشته بلکه از میلین‌سازی مجدد جلوگیری کند و از این طریق تخریب میلین، پایدار و گسترده گردد.

تقدیر و تشکر

ضمن سپاس و درود به روح دکتر سعید کاظمی آشتیانی که حمایت‌های بی‌دریغ خود را جهت تصویب این پروژه ارائه نمودند، مراتب قدردانی از پژوهشکده رویان به جهت تامین اعتبارات پروژه اعلام می‌گردد.

References

1. Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2004; 113: 788-794.
2. Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004; 229: 12-20.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002; 359: 1221-1231.
4. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 683-747.
5. Duzhak T, Emerson MR, Chakrabarty A, Alterman MA, Levine SM. Analysis of protein induction in the CNS of SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis

(یوبیکینون) Fe-s پروتئین ۸ (Ndufs8) شناسایی گردید، که یک عضو از کمپلکس I است. هم‌چنین نقطه شماره ۸۹ در ژل‌های نخاع در نمره بالینی ۱ و ۳ کاهش بیان نسبت به گروه کنترل نشان داد. این نقطه پس از اسپکترومتری جرمی به عنوان NADH دهیدروژناز (یوبیکینون) فلاوو پروتئین ۲ (Ndufv2) شناسایی شد که عضوی از کمپلکس I است.

کمپلکس I پستانداران از ۴۵ زیر واحد متفاوت تشکیل شده است. زیر واحد Ndufs8 از کمپلکس I فعالیت‌های NADH دهیدروژناز و اکسیدوردوکتاز و زیر واحد Ndufv2 فعالیت NADH دهیدروژناز و هم‌چنین انتقال الکترون را دارد (۲۳، ۲۴). مطالعات قبلی نشان داده است که فعالیت کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندری در بافت به دست آمده از ضایعات فعال مزمن مالتیپل اسکلروزیس کاهش یافته است (۱۸، ۱۹). مطالعات اخیر نشان داده است که اختلالات در زیر واحد کمپلکس I می‌تواند به دژنراسیون عصبی و تخریب میلین منجر گردد (۲۷-۲۵). هاپلو تایپ‌های پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن‌های هسته‌ای کمپلکس I ارتباط با MS را تأیید می‌کند (۲۸). نقص کمپلکس I در بافت ماهیچه‌ای بیماران MS نیز توسط کومله و همکاران گزارش گردید (۲۹).

هم‌چنین نقاط پروتئینی ۱۱۵ و ۱۳۶ در ژل‌های مغز به عنوان دو عضو کمپلکس IV شناسایی شد. با آنالیز اسپکترومتری، نقطه ۱۱۵ به عنوان زیر واحد Va سیتوکروم C اکسیداز، و نقطه ۱۳۶ به عنوان زیر واحد Vb سیتوکروم C اکسیداز شناسایی شدند.

سیتوکروم C اکسیداز یک کمپلکس آنزیمی است که انتقال الکترون‌ها از سیتوکروم C به مولکول اکسیژن را انجام می‌دهد. زیرواحدهای Va و Vb از سیتوکروم C اکسیداز زیرواحدهای گذشته توسط هسته از چرخه تنفسی میتوکندری انسانی هستند. عملکردهای این زیر واحدها ناشناخته است، اما این احتمال می‌رود که نقش تنظیم و هم‌گذاری کمپلکس I ایفا کنند (۳۰، ۳۱). کاهش عملکرد کمپلکس IV مرتبط با کاهش بیان ژن‌های (کدشونده توسط هسته) پروتئین‌های میتوکندریایی در بافت کورتکس حرکتی بیماران MS دیده شده است.

هم‌چنین کاهش بیان پروتئین‌های دیگر میتوکندریایی شامل گلو تاردوکسین ۵ (نقطه ۱۴۳)، استرادیول ۱۷ تا دهیدروژناز ۸ (نقطه ۲۳۱)، و ایزوسیترات دهیدروژناز (نقطه ۴۵۲) را در مغز مشاهده نمودیم.

نقطه شماره ۲۶ نخاعی که در گروه‌های نمره بالینی ۱ و ۳ کاهش چشم‌گیری در مقایسه با گروه کنترل داشت، با استفاده از اسپکترومتری جرمی به عنوان ATP5B شناسایی شد که یک پروتئین کمپلکس V است. میتوکندری متشکل از زنجیره تنفسی است که انرژی به شکل

by proteomic screening and immunohistochemistry. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2003; 49: 723-732.

6. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006; 129: 1953-1971.

7. Frausto RF, Crocker SJ, Eam B, Whitmire JK, Whitton JL. Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced experimental allergic encephalomyelitis and T cell responses are unaffected by immunoproteasome deficiency. *J Neuroimmunol*. 2007; 192: 124-133.

8. Baxter AG. The origin and application of experimen-

- tal autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 904-912.
9. Avasarala JR, Wall MR, Wolfe GM. A distinctive molecular signature of multiple sclerosis derived from MALDI-TOF/MS and serum proteomic pattern analysis: detection of three biomarkers. *J Mol Neurosci*. 2005; 25: 119-125.
10. Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J. Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics*. 2004; 4: 2117-2124.
11. Liu T, Donahue KC, Hu J, Kurnellas MP, Grant JE, Li H, et al. Identification of differentially expressed proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by proteomic analysis of the spinal cord. *J Proteome Res*. 2007; 6: 2565-2575.
12. Ibrahim SM, Mix E, Bottcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, et al. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*. 2001; 124: 1927-1938.
13. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002; 8: 500-508.
14. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*. 1997; 18: 533-537.
15. Chambers G, Lawrie L, Cash P, Murray GI. Proteomics: a new approach to the study of disease. *J Pathol*. 2000; 192: 280-288.
16. Kappos L, Achtnichts L, Dahlke F, Kuhle J, Naegelin Y, Sandbrink R, et al. Genomics and proteomics: role in the management of multiple sclerosis. *J Neurol*. 2005; 252 Suppl 3: iii21-iii27.
17. Focking M, Boersema PJ, O'Donoghue N, Lubec G, Pennington SR, Cotter DR, et al. 2-D DIGE as a quantitative tool for investigating the HUPO Brain Proteome Project mouse series. *Proteomics*. 2006; 6: 4914-4931.
18. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006; 59: 478-489.
19. Lu F, Selak M, O'Connor J, Croul S, Lorenzana C, Butunoi C, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2000; 177: 95-103.
20. Mahad D, Ziabreva I, Lassmann H, Turnbull D. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2008; 131: 1722-1735.
21. Baharvand H, Hajheidari M, Ashtiani SK, Salekdeh GH. Proteomic signature of human embryonic stem cells. *Proteomics*. 2006; 6: 3544-3549.
22. Nasrabadi D, Rezaei Larijani M, Pirhaji L, Gourabi H, Shahverdi A, Baharvand H, et al. Proteomic Analysis of Monkey Embryonic Stem Cell during Differentiation. *J Proteome Res*. 2009.
23. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 389-402.
24. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*. 2003; 348: 2656-2668.
25. Qi X, Lewin AS, Hauswirth WW, Guy J. Suppression of complex I gene expression induces optic neuropathy. *Ann Neurol*. 2003; 53: 198-205.
26. Smeitink J, van den Heuvel L. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet*. 1999; 64: 1505-1510.
27. Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC, Huang TT, Epstein CJ, Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem*. 1998; 273: 28510-28515.
28. Vyshkina T, Banisor I, Shugart YY, Leist TP, Kalman B. Genetic variants of Complex I in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2005; 228: 55-64.
29. Kumleh HH, Riazi GH, Houshmand M, Sanati MH, Gharagozli K, Shafa M. Complex I deficiency in Persian multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2006; 243: 65-69.
30. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2002; 1: 232-241.
31. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett*. 1994; 356: 295-298.
32. Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1410: 215-228.
33. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain*. 1995; 118 (Pt 2): 319-337.
34. Lees F. Cervical Spondylosis. *Nurs Times*. 1964; 60: 1240-1242.
35. Qi X, Lewin AS, Sun L, Hauswirth WW, Guy J. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem*. 2006; 281: 31950-31962.

Central Nervous System Proteomics in Animal Model of Multiple Sclerosis Revealed Down-Regulation of Mitochondrial Proteins

Abolhassan Shahzadeh Fazeli, M.D.^{1,2,3}, Mohammad Hossein Sanati, Ph.D.^{3*}, Davood Nasrabadi, M.Sc.¹, Alireza Pouya, M.Sc.¹, Hossein Baharvand, Ph.D.^{1,4}, Ghasem Hosseini Salekdeh, Ph.D.^{1,5*}

1. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
2. Genetics Department, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3. Medical Genetics Department, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4. Developmental Biology Department, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran
5. Physiology and Proteomics Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

* Corresponding Addresses:

P.O.Box: 19395-4644, 1. Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

Email: salekdeh@royaninstitute.org

P.O.Box: 14155-6343, Medical Genetics Department, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

Email: m-sanati@nigeb.ac.ir

Received: 6/Apr/2009, Accepted: 20/May/2009

Abstract

Objective: Detection of central nervous system (CNS) molecular defects in an animal model of multiple sclerosis.

Materials and Methods: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced by a myelin oligodendrocyte glycoprotein. Protein expression profiles in the central nervous system between healthy clinical scores 1 and 3 of EAE were studied using a two dimensional electrophoresis based proteomics approach coupled with MALDI TOF/TOF mass spectrometry.

Results: We identified 8 mitochondrial proteins that were differentially expressed in CNS, all of them down-regulated in scores 1 and/or 3. Of these, 5 proteins belong to the mitochondrial respiratory chain including: NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8, cytochrome c oxidase Va, cytochrome c oxidase Vb, ATP5B, NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavo-protein 2. We also observed down-regulation of three other mitochondrial proteins including: glutaredoxin 5, estradiol 17 beta-dehydrogenase 8 and isocitrate dehydrogenase.

Conclusion: Down-regulation of mitochondrial proteins supported the hypothesis that hypoxia-like tissue injury in multiple sclerosis (MS) lesions may be due to mitochondrial impairment.

Keywords: Mitochondria, Proteomics, EAE, Multiple Sclerosis

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 236-243