بررسی ایمیونوسیتوشیمیائی تغییرات میکروتوبول در سلولهای لوکمی تمایز یافته به وسیله رتینوئیک اسید

شهین احمدیان* ، یعقوب پاژنگ و مهشید شفیع زاده

تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی، بیوفیزیک، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت ۸۵/۹/۲۵ تاریخ پذیرش:۸۵/۱۲/۲٦

چکیده

میکروتوبولها یکی از مهمترین ترکیبات اسکلت سلولی هستند که در فرآیندهای مهم سلول از جمله در حرکات و تقسیم سلولی، نقل و انتقالات درون سلولی و علامات سلولی نقش دارند. همچنین هدف چندین داروی ضد سرطان می‌باشند که اهمیت آنها را در حفظ حیات سلول نشان می‌دهد. بخش مهمی از تمایز سلولهای لوکمی به گرانولوسیتهای بالغ بر اثر آل-ترانس-رتینوئیک اسید(All- Trans- Retinoic Acid) یا ATRA ، یک داروی شناخته شده برای درمان لوکمی پرومیلولتیک حاد، شامل توانائی آنها در سازماندهی مجدد میکروتوبولها است. در این تحقیق مقدار گاما ، آلفا- و آلفا توبولین استیله و طرح توزیع آنها در سیتوپلاسم و قدرت سانتروزوم در سازماندهی مجدد میکروتوبولهای سلولهای لوکمی HL-60 در مراحل تمایز القاء شده بوسیله رتینوئیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقدار گاما- توبولین با القاء تمایز در سلولهای HL-60 افزایش یافته و طرح سیتوپلاسمی کانونی شده از سانتروزوم را نشان می‌دهد و همچنین توانائی سازماندهی مجدد میکروتوبولها سلولهای تمایز یافته با آزمایش نوکودازول نشان داده شد که سلولهای تمایزنیافته فاقد این توانائی می باشند. مقدار آلفا- و آلفا توبولین استیله در سلولهای تمایز یافته در مقایسه با سلولهای نرمال تمایز نیافته کاهش می یابد و توزیع سیتوپلاسمی آنها سازماندهی منظم‌تری را نسبت به سلولهای نرمال نشان می‌دهد. نتایج حاصل، طرح هسته‌ای شدن میکروتوبولهای منظم و سانتروزومی در سلولهای HL-60 را بعد از تمایز و احتمالاً از طریق تنظیم بالادست گاما- توبولین پیشنهاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: میکروتوبول، تمایز، سلولهایHL-60 ، گاما- توبولین، ایمیونوسیتوشیمی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٦٦٩٥٦٩٨٣، پست الکترونیک: ahmadian@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

تمایز درمانی سلولهای سرطان، درگیر القاء تمایز در این سلولها و در نتیجه جلوگیری از تکثیر بیشتر آنها می‌باشد. یکی از موفق‌ترین مثالهای کلینیکی تمایز درمانی، درمان لوکمیاپرومیلوستیک حاد (Acute-Promyelocytic Leukemia) با رتینوئیک اسید می‌باشد که نسبت بالائی از معالجه بیماران توسط القاء تمایز و اپوپتوز سلولهای پرومیلوستیک را در برمی‌گیرد (۲٤ و۳۱) وخط سلولی HL-60 بعنوان یکی از مدلهای استاندارد *in vitro* در تمایز درمانی لوکمیا با ATRA محسوب می‌شود(۷و۱۵).

بهنگام فرآیند تمایز سیتواسکلتون سلول دچار تغییرات اساسی می‌شود. ترکیبات اصلی سیتواسکلتون یعنی میکروتوبولها، میکروفیلامانها و فیلامانهای حد واسط، شبکه ای ساختمانی را تشکیل می‌دهند که غشاءهای سلولی، ارگانلهای درون سلولی و هسته را بیکدیگر متصل می‌سازند. تمایز سلولی در گیر سازمانی فضائی است که با تنظیم دینامیک ناپایداری میکروتوبولها ایجاد می‌شود و در کنترل دقیق آنها مهمترین مسئله ترتیب و جهت شبکه میکروتوبولی بهنگام تمایز سلولی می‌باشد (۲، ٦، ۱۰ ،۱۳

Archive of SID
www.SID.ir

و۲۰). سلولهای جانوری در انترفاز شامل یک ردیف سیتوپلاسمی از میکروتوبول می‌باشند که معمولا از یک مرکز سازماندهی میکروتوبولی (MTOC)

(Microtubule organizing center) یا سانتروزوم نزدیک هسته شعاعی می‌شوند بنحوی که انتهای منفی میکروتوبولها در سانتروزوم فرو رفته و انتهای مثبت آنها به طرف سطح سلول می‌باشد. MTOC معرف مکان ویژه‌ای است که از آن میکروتوبولها هسته‌ای می‌گردند. یک ترکیب اصلی MTOC، گاما- توبولین می‌باشد که حدود ۳۵-۲۸ درصد با آلفا و بتا- توبولین همولوژی دارد و کمتر از این دو ایزوفرم بیان می‌شود. آنتی‌بادی ضد گاماتوبولین از رشد دوباره MT از سانتروزوم در سلولهای جانوری جلوگیری می‌کند، این موضوع نشان می‌دهد که هسته‌ای شدن میکروتوبول در تمام سیکل سلولی بستگی به گاما- توبولین دارد (۸ و۱۲). گاما- توبولین با اتصال به ترکیبات دیگری تشکیل یک مجموعه حلقه‌ای شکل بقطر ۲۵ نانومتر را برای هسته‌ای شدن میکروتوبول می‌دهد (۲٦و۲۹). همچنین گاما- توبولین بشکل مجموعه کوچکتری نیز در سیتوپلاسم وجود دارد. هسته‌ای شدن میکروتوبول می‌تواند از طریق عمل سیتوزولی و یا سانتروزومی گاما- توبولین حاصل شود (۱۸). در برخی از گزارشات آمده است که MTOC های غیر سانتروزومی که آنها نیز دارای گاما- توبولین می‌باشند نقش اساسی را در گیاهان و همچنین در دوره جنینی موشها بازی می‌کنند (۹و۱۷). در این تحقیق تغییرات میکروتوبول بهنگام فرآیند تمایز با تأکید بر نقش گاما- توبولین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

کشت سلول و القاء تمایز: سلولهای میلوئیدی لوکمیا (خریداری شده از انستیتو پاستور ایران (NCBI code C427 در محیط کشت RPMI، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین تحت شرایط استاندارد کشت داده شد. در شروع هر آزمایش، ۵ ml از سوسپانسیون سلولی در غلظت 10^6/ml سلول به فلاسکهای کشت (۲۵ cm^2) اضافه گردید. سپس محلول ATRA در غلظت نهائی 10^{-6} M به محیط کشت سلولی اضافه شد. بهنگام فرآیند تمایز، محیط کشت پس از گذشت زمان ٤۸ ساعت خالی و با محیط کشت تازه حاوی ATRA جایگزین شد. بطور همزمان محیط تازه فاقد ATRA به فلاسکهای کنترل اضافه گردید. جهت مشاهده مورفولوژی سیتواسکلتون میکروتوبول در هر آزمایش دو نمونه آزمایش و کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

ایمیونوفلوروسنت میکروسکوپی: سلولها ابتدا بر روی لاملهای پوشیده شده از پلی-ال-لیزین (Poly-L-Lysine)سانتریفوژ، سپس بمدت ۱۰ دقیقه در متانول (۲۰- درجه سانتی گراد) قرار داده شد. لاملها با PBS و سپس سه بار در بافر آنتی‌بادی (PBS ، BSA ۳ درصد ، Tritonx-100 ۰.۱ درصد ،azide ۰.۰۲ درصد) شستشو داده شد. آنتی‌بادیهای اولیه (ضد آلفا و آلفا استیله و ضد گاما خریداری شده از سیگما) با غلظت نهائی ۱۰۰/ ۱در بافر آنتی‌بادی به لامل اضافه و بمدت ۹۰ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه شد. سلولها پس از سه بار شستشو با بافر آنتی‌بادی، در آنتی‌بادی ثانویه فلوروسنت (FITC) بمدت ٤۵ دقیقه انکوبه و پس از شستشو در بافر آنتی‌بادی در محلول هوخست (Hoechest 333492، سیگما) با غلظت ۱ µg/ml بمدت ۳۰ دقیقه جهت رنگامیزی DNA انکوبه شد. نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنس زایس و با فیلترهای FITC, DAPI مشاهده و تصاویر با دوربین CCD ثبت گردید (۱و۲۵).

ایمیونوبلاتینگ: تعداد مساوی از سلولها در بافر لیزکننده (1 mM DTT, 1M EDTA, 10 µM PMSF, 2 M sucrose) لیز و بمدت ٤۵ دقیقه در ٤ºC در ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد. مقدار مساوی از پروتئین (µg

Archive of SID

www.SID.ir

۱۰) به نسبت ۱:۱ با بافر نمونه مخلوط و در ژل آکریل‌آمید (۱۵ درصد) به روش لاملی (Lamelli) الکتروفورز و سپس با استفاده از روش استاندارد بر روی غشاء نیتروسلولز منتقل گردید. غشاها بمدت ۱/۵ ساعت در محلول بلاتینگ حاوی ۵ درصد شیر خشک بدون چربی در بافر PBS و سپس در محلول آنتی‌بادیهای اولیه بمدت ۲ ساعت انکوبه شده و پس از سه بار شستشو در بافر (PBS, pH 7.5, Tween 20=0.05%) بمدت یکساعت در آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شد و در نهایت باندها با استفاده از سوبستراهای ویژه آنتی‌بادی‌های ثانویه ظاهر شد (۲۵).

آزمایش فلوسیتومتری با آنتی‌ژنهای سطحی سلول: سلولها بمدت ۳۰ دقیقه در محلول حاوی آنتی‌بادی CD11b-FITC انکوبه و پس از سه بار شستشو با PBS با دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson) مورد بررسی قرار گرفت (۲۵).

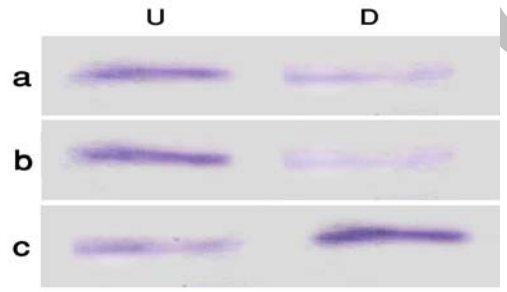
آزمایش NBT: آزمایش نیتروبلو- تترازولیوم (NBT) (Nitro-Blue-Tetrazolium) با استفاده از محلول حاوی (٤-نیتروبلوتترازولیوم ۲mg، myrisate 13- acetate و ng Phorbol 12 ۲۰۰ در حجم نهائی ml ۱ آب مقطر انجام شد. حجمهای مساوی از محلول NBT و سلول بمدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و سپس بر روی لام پوشش داده شده با پلی- ال- لیزین منتقل شد. سلولهای تمایزیافته با ایجاد رنگ فورمازان به رنگ قهوه‌ای تیره درمی‌آیند (۳۰).

آزمایش نوکودازول: نوکودازول در محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل و سپس در غلظت نهائی ng/ml ۱۰ به سلولها اضافه گردید. سلولها سپس بمدت ۳۰ دقیقه با محیط حاوی نوکودازول و ۱۰ درصد سرم انکوبه شدند. پس از دوبار شستشو با PBS ، سلولها این بار بمدت ۲ ساعت در محیط فاقد نوکودازول انکوبه و سپس بر طبق روش قبلی برای رنگامیزی آلفا- توبولین جهت میکروسکوپ ایمیونوفلوروسنس آماده‌سازی شدند (۱).

نتایج

سلولهای HL-60 پس از تیمار با ATRA بسمت گرانولوسیتها تمایز پیدا کردند که با آزمایشات NBT و بیان CD11b مورد تأیید قرار گرفت. مهار رشد سلولها در مقایسه با سلولهای نرمال، سه روز بعد از تیمار با ATRA مشاهده شد ولی در روزهای چهارم و پنجم پس از تیمار با ATRA، رشد سلولها مهار قابل توجهی را نشان دادند (شکل a-۱). سلولهای NBT مثبت (شکل b-۱) و CD11b مثبت (شکل c-۱) در روز سوم مشاهده شدند که تا روز پنجم تیمار با ATRA تعدادشان روبه افزایش بود.

مقادیر نسبی گاما- توبولین و الفا- والفا- توبولین استیله: مقدار نسبی الفا- توبولین (شکل a-۲) و الفا- توبولین استیله (شکل b-۲) ۹٦ ساعت پس از القاء تمایز با ATRA کاهش می یابد اما مقدار گاما- توبولین پس از تمایز بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان می‌دهد (شکل c- ۲).

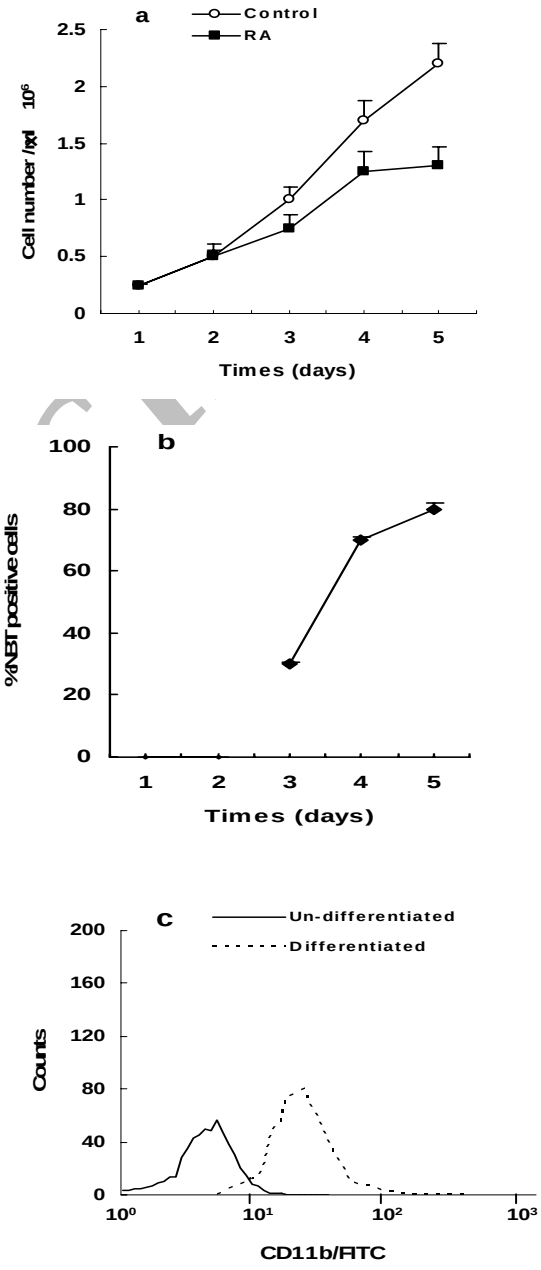


شکل ۲: بررسی ایمیونوبلات الفا- توبولین (a) ، الفا- توبولین استیله (b) و گاما- توبولین (c) در سلولهای HL-60 تمایزنیافته(U) و تمایزیافته (D).

تغییرات میکروتوبول پس از القاء تمایز: در سلولهای تمایز یافته HL-60 ، خطوط شعاعی از میکروتوبولها از سمت هسته نشات گرفته و اغلب تا زیر غشاء سیتوپلاسمی کشیده می شوند. رنگ آمیزی دوگانه برای هسته و شبکه میکروتوبول، اجازه شناسائی سلولها را بر اساس مورفولوژی هسته می‌دهد. سلولها با هسته چند لوبی

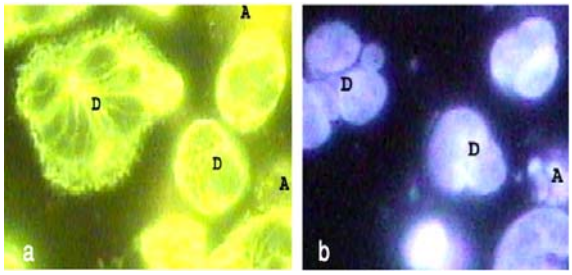
www.SID.ir

بعنوان سلول‌های تمایز یافته و با هسته قطعه‌قطعه شده بعنوان اپوپتوز، توسط رنگ آمیزی هوخست شناسائی می‌شدند (شکل b ، a-۳).



شکل ۱: اثر ATRA بر رشد و تمایز سلول‌های HL-60 . سلول‌ها با ۱ µM ATRA تیمار و در زمانهای معین تعداد سلول‌ها (a) و سلول‌های NBT مثبت (b) تعیین شد. (c) بررسی فلوسیتومتری بیان آنتی‌ژن سطحی CD11b را بر روی سلول‌های HL-60 تمایز یافته و تمایزنیافته پس از تیمار با ۱ µM ATRA در روز چهارم نشان می‌دهد. بارها معرف سه آزمایش جداگانه با SE± می‌باشند.

در سلولهای تمایزنیافته ، خط ظریفی از الفا- توبولین استیله در اطراف هسته سلول دیده می‌شود (شکل a-٤) در حالیکه در سلولهای تمایز یافته الفا- توبولین استیله بصورت شبکه نسبتا شفافی از میکروتوبولهای منشاء گرفته از MTOC در اطراف هسته مشاهده می‌شوند (شکل c-٤). شکلهای b-٤ و d-٤ رنگامیزی هوخست همان سلولها را جهت تشخیص هسته سلولهای نرمال از تمایزیافته نشان می‌دهند.



شکل ۳: (a) رنگ آمیزی ایمیونوفلوروسنس الفا- توبولین در سلولهای HL-60 تمایزیافته (D) و اپوپتوز یافته (A)، (b) مورفولوژی هسته در همان سلولها جهت تشخیص سلولهای تمایز یافته از سلولهای اپوپتوتیک بوسیله رنگامیزی هوخست.

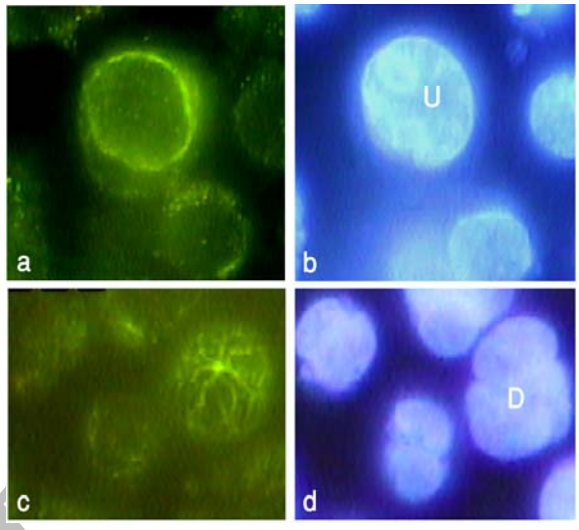
توزیع گاما- توبولین در مراحل تمایز: رنگ آمیزی گاما- توبولین در نواحی سانتروزومی سلولهای تمایزیافته HL-60 شدیدتر از سلولهای تیمارنشده با ATRA است. در این سلولها سیتوپلاسم نیز بطور پراکنده رنگ می گیرد. در سلولهای نرمال تمایزنیافته ، رنگ آمیزی سانتروزومی کمرنگ و رنگامیزی سیتوپلاسمی بسیار ضعیفی برای گاما- توبولین مشاهده می شود (شکل b , a- ٥).

توانائی هسته‌ای کردن میکروتوبول بوسیله گاما- توبولین

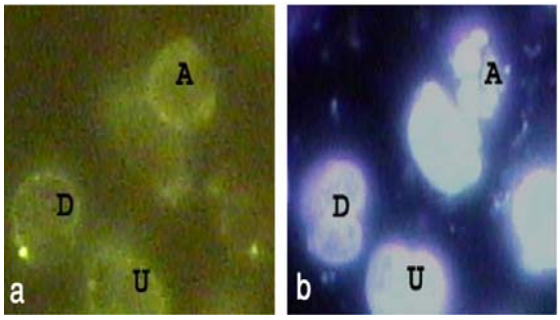
سلولهای نرمال و تیمارشده با ATRA با نوکودازول انکوبه شده را پس از شستشو، و گذشت زمان کافی برای دوباره تشکیل شدن میکروتوبول در سلولها یعنی حدود دو ساعت در سلولهای نرمال تمایز نیافته هیچ نشانی از هسته‌ای شدن میکروتوبلها مشاهده نمی شود، بلکه رنگ آمیزی پراکنده‌ای از میکروتوبولها در این سلولها دیده می‌شود که احتمالاً

Archive of SID
www.SID.ir

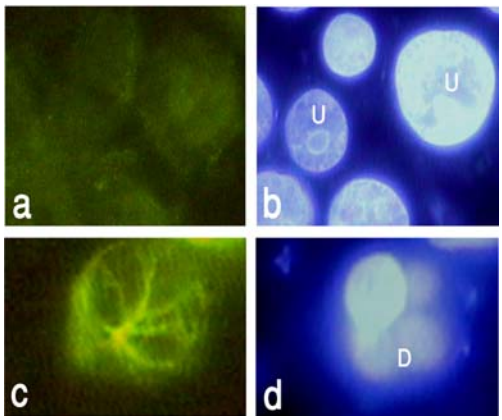
مربوط به دپلیمریزه شدن شبکه میکروتوبولها است (شکل a , b - ۶)، در حالیکه در سلولهای تمایزیافته شبکه میکروتوبولی تقریباً بطور کامل تشکیل می شود (شکل c , d- ٦).



شکل ٤: رنگ آمیزی ایمیونوفلوروسنس از الفا- توبولین استیله (a) در سلول نرمال و (c) سلول تمایز یافته. b و d مورفولوژی هسته را بترتیب در سلول‌های نرمال و تمایز یافته نشان می‌دهد. در سلولهای تمایزیافته الفا- توبولین استیله بصورت شبکه‌ای از میکروتوبولها در اطراف هسته مشاهده می‌شود. U= تمایزنیافته و D= تمایزیافته.



شکل ٥: (a) رنگ آمیزی ایمیونوفلوروسنس گاما- توبولین در سلولهای HL-60 . در سلولهای تمایزیافته (D) شدت رنگ گاما- توبولین در نواحی سانتروزومی نسبت به سلولهای تمایزنیافته (U) بیشتر است. در سلولهای اپوپتوتیک (A) رنگ آمیزی پراکنده سیتوپلاسمی شدیدتر از سلول تمایز یافته می‌باشد. (b) مورفولوژی هسته سلولهای شکل a را نشان می‌دهد.



شکل ٦- آزمایش نوکودازول- رنگ آمیزی ایمیونوفلوروسنس با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه آلفا- توبولین. (a) عدم تشکیل مجدد میکروتوبولها در سلولهای تمایز نیافته بعد از تیمار با نوکودازول و پس از دوساعت انکوبه شدن در محیط بدون نوکودازول (c) : تشکیل شبکه میکروتوبولی در سلولهای تمایزیافته، در همان شرایط. b و d مورفولوژی هسته سلولهای نرمال و تمایزیافته بترتیب.

بحث

میکروتوبول در سلولهای لوکمی پس از تیمار با ATRA نشان می دهد که تغییرات ویژه‌ای را متحمل می‌شود. تغییرات ساختمان میکروتوبول قبلاً بوسیله میکروسکپ الکترونی در سلولهای HL-60 نشان داده شده است. سلولهای تمایزنیافته دارای میکروتوبولهای کمی در اطراف سانتریول هستند، اما در سلولهای تمایزیافته میکروتوبولهای زیادی از سانتریول، شعاعی شده و بطرف سطح سلول کشیده می‌شوند (۳).

اولنز (Olins) و همکاران، با استفاده از میکروسکپ Confocal در سلولهای HL-60 نشان داده‌اند که نواحی سانتروزومی در سلولهای تمایز نیافته نزدیکتر به هسته ظاهر می‌شوند، اما در مراحل تمایز بفاصله دورتری مهاجرت می‌کنند. میکروتوبولها معمولاً بصورت بیضوی در اطراف هسته نمایان می‌شوند، اما در سلولهای تمایز یافته شکل آنها بصورت خطوط موازی است که از سانتروزوم منشاء می‌گیرند (۱۹). ما در این تحقیق طرح مشابهی از تغییرات میکروتوبول در سلولهای HL-60 تمایزیافته بوسیله ATRA با میکروسکپ ایمیونوفلوروسنس مشاهده

Archive of
www.SID.ir

کردیم که شبیه نتایج بدست آمده در تحقیقات Leung و همکاران می‌باشد (۱٦). در سلولهای HL-60 تمایزیافته بوسیله تترادکانویل فوربال استات (12-o-tetradecanoylphorbol-13acetate) (TPA) که باعث تمایز ماکروفاژی می‌شود نیز طرح تصادفی میکروتوبولها بسمت یک شبکه منظم منشاء گرفته از اطراف هسته بسوی سطح سلول نشان داده شده است (۲۸). تحقیقات قبلی نتایج متناقضی را بر روی مقدار آلفا- توبولین پس از تمایز با ATRA گزارش کرده‌اند. در یک تحقیق افزایش مقدار آلفا- توبولین با فلوسیتومتری (۱٦) و در تحقیقی دیگر ثابت ماندن مقدار آلفا- توبولین پس از تمایز با ATRA توسط وسترن بلات نشان داده است. در تحقیق حاضر ما نتایج متفاوتی با وسترن بلاتینگ بدست آوردیم که نشان دهنده کاهش مقدار آلفا- توبولین می‌باشد که ممکن است مربوط به حساسیت روشهای بکار گرفته و یا آنتی‌بادیهای مورد استفاده باشد. دخالت این تغییرات در ساختمان و عمل میکروتوبول در تمایز سلولهای HL-60 هنوز کاملاً مشخص نشده است. تیمار با نوکودازول، باعث حذف چندلوبی شدن هسته بوسیله ATRA می‌شود که نشان می‌دهد که میکروتوبولها احتمالاً در فرآیند چندلوبی شدن هسته درگیر هستند (۲۱). اخیراً چنین مشاهداتی با استفاده از زیرخط دیگری از سلولهای HL-60 توسط محققین دیگر مورد بحث و بررسی قرار گرفته‌است (۵). در گزارش دیگری آمده است که توانائی سلولهای تمایزیافته HL-60 بطرف منوسیت در فاگوسیتوز بستگی به ساخته شدن میکروتوبولها دارد (۲۳و۲٤).

در این تحقیق نشان داده‌ایم که مقدار گاما- توبولین در سلولهای تمایز یافته افزایش یافته و همچنین در آزمایش نوکودازول مشخص شد که سانتروزوم پس از تمایز در هسته‌ای شدن میکروتوبولها بصورت قویتری عمل می‌کند. در کل این نتایج را می‌توان بعنوان شاهدی برای نقش گاما- توبولین در هسته‌ای شدن میکروتوبولها، در القاء تمایز سلولهای HL-60 توسط ATRA در نظر گرفت. بیان آنتی‌ژن سطحی CD11b بخش مهمی از تمایز سلولهای HL-60 را تشکیل می‌دهد (۱۱). از طرفی سازماندهی مجدد میکروتوبولها اثری حیاتی در انتقال وزیکولهای حاوی CD11b در سلولهای U937 تمایز یافته بوسیله TPA دارد (۱٤). نتایج ما بیان می‌دارد که فرآیند دوباره سازماندهی میکروتوبول اهمیت یکسانی را با بیان CD11b در تمایز سلولهای HL-60 داراست و به احتمال زیاد گاما- توبولین یک عنصر کلیدی در این فرآیند می‌باشد.

میکروتوبولهای دینامیک با استفاده از توبولینهای آزاد تغییرنیافته (Unmodified) بسرعت رشد می‌کنند و یا کوتاه می‌شوند. میکروتوبولهای پایدار، همزمان از افزایش غلظت فرمهای تغییریافته پس از ترجمه توبولینها (استیله و تیروزینه شده) شکل می‌گیرند (۲۷). تحقیقات نشان داده است که استیله و تیروزینه شدن توبولین حوادث اصلی در پدیده مربوط به تمایز می‌باشند (۱۰). نتایج این تحقیق نشان می دهد که میکروتوبولهای استیله در پی تمایز طرح منظمی، بسیار شبیه به شبکه توبولین غیراستیله را تشکیل می‌دهند، بعنوان مثال طرح شعاعی میکروتوبولهای نشأت گرفته از سانتروزوم. تصور می‌شود که میکروتوبولهای استیله استحکام ساختمانی سلول را افزایش داده و همچنین بعنوان مسیر حرکت وزیکولها (احتمالاً برای انتقال وزیکولهای CD11b در سلولهای HL-60) نقش فعالی را بازی می‌کنند (٤، ۲۲). بطور کلی چنین نتایجی نقش حیاتی هسته‌ای شدن منظم میکروتوبول در تمایز دودمان سلولی HL-60 تحت تأثیر ATRA را نشان می‌دهد.

قدردانی و تشکر: بدینوسیله از کمکهای آقای کیوان بلوری در تهیه عکسها تشکر و قدردانی می‌شود. هزینه‌های اجرای این تحقیق از محل بودجه پژوهش دانشگاه تهران بشماره (٦٤۰/۰۰۷/٦/۰۱) تأمین گردیده است.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1- Bobinnec, Y., Fukuda, M., Nishida, E. 2000. Identification and characterization of Caenorhabditis elegans γ-tubulin in dividing cells and differentiated tissues. Journal of Cell Science.113:3747-3759.

2- Bre, M.H., Pepperkok, R., Hill, A.M., Levilliers, N., Ansorge, W., Stelzer, E.H., Karsenti, E., 1990. Regulation of microtubule dynamics and nucleation during polarization in MDCK II cells. J. Cell Bio. 111:3013-21.

3- Brown, W.J., Norwood, C.F., Smith, R.G., Snell, W.J., 1981. Development of capping ability during differentiation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J. Cell Physiol. 106(1):127-36.

4- Bulinski, J.C., Richards, J.E., Piperno, G., 1988. Posttranslational modifications of alpha tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. J. Cell Biol. 106(4):1213-20.

5- Campbell, M.S., Lovell, M.A., Gorbsky, G.J., 1995. Stability of nuclear segments in human neutrophils and evidence against a role for microfilaments or microtubules in their genesis during differentiation of HL60 myelocytes. J. Leukoc. Biol. 58(6):659-66.

6- Dinsmore, J.H., Solomon, F., 1991. Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. Cell 64(4):817-26.

7- Drexler, H.G., Quentmeie,r H., MacLeod, R.A., 1995. Leukemia cell lines: in vitro models for the study of acute promyelocytic leukemia. Leuk. Res. 19(10):681-91.

8 - Felix, M.A., Antony, C., Wright, M., Maro, B., 1994. Centrosome assembly in vitro: role of gamma-tubulin recruitment in Xenopus sperm aster formation. J. Cell Biol. 124(1-2):19-31.

9- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., Maro, B., 1993. Gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. J. Cell Sci. 105:157-66.

10- Gundersen, G.G., Khawaja, S., Bulinski, J.C., 1989. Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. J. Cell Biol. 109(5):2275-88.

11- Hickstein DD , Back AL , Collins SJ (1989) Regulation of expression of the CD11b and CD18 subunits of the neutrophil adherence receptor during human myeloid differentiation. J Biol Chem 264(36):21812-7.

12- Joshi HC, Palacios MJ, McNamara L (1992) Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. Nature 356(6364):80-3.

13- Kelly, R.B., 1990. Microtubules, membrane traffic, and cell organization. Cell. 61(1):5-7.

14- Kiley, S.C., Parker, P.J., 1997. Defective microtubule reorganization in phorbol ester-resistant U937 variants: reconstitution of the normal cell phenotype with nocodazole treatment. Cell Growth Differ. 8(2):231-42.

15- Lamkin, T.J., Chin, V., Yen, A., 2006, All-trans retinoic acid induces p62DOK1 and p56DOK2 expression which enhances induced differentiation and G0 arrest of HL-60 leukemia cells.Am. J. Hematol. 81(8):603-15.

16- Leung, M.F., Sokoloski, J.A., Sartorelli, A.C., 1992. Changes in microtubules, microtubule-associated proteins, and intermediate filaments during the differentiation of HL-60 leukemia cells. Cancer Res 52(4):949-54.

17- Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C., Palevitz, B.A., 1993. A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. J. Cell Sci. 104:1217-28.

18- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M., Bornens, M., 1996. Gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms. J. Cell Sci. 109:875-87.

19- Olins, A.L., Herrmann, H., Lichter, P., Olins, D.E., 2000, Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. Exp. Cell Res. 254(1):130-42.

20-Olins, A.L., Olins, D.E., 2004. Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. BMC. Cell Biol. 5:30.

21- Olins, A.L., Olins, D.E., 2005, The mechanism of granulocyte nuclear shape determination: possible involvement of the centrosome. Eur. J. Cell Biol., 84(2-3):181-8.

22- Piperno, G., Dizet, M.L., Chang, X., 1987. Microtubules containing acetylated α-tubulin in mammalian cells in culture. J. cell boil. 104:289-302.

Archive of SID

www.SID.ir

23- Reibman, J., Haines, K.A., Gude, D., Weissmann, G., 1991. Differences in signal transduction between Fc gamma receptors (Fc gamma RII, Fc gamma RIII) and FMLP receptors in neutrophils. Effects of colchicine on pertussis toxin sensitivity and diacylglycerol formation. J. Immunol. 146(3):988-96

24- Robertson, K.A., Emami, B., Mueller, L., Collins S.J., 1992. Multiple members of the retinoic acid receptor family are capable of mediating the granulocytic differentiation of HL-60 cells. Mol. Cell Biol. 12(9):3743-9.

25- Roy, M.K., Thalang, V.N., Trakoontivakorn, G., Nakahara, K., 2004. Mechanism of mahanine-induced apoptosis in human leukemia cells (HL-60). Biomedical Pharmacology. 67:41-51.

26- Schiebel, E., 2000. Gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. Curr. Opin. Cell Bio. 12(1):113-8.

27- Schulze, E., Asai, D.J., Bulinski, J.E., Kirschner, M., 1987. Posttranslational modification and microtubule stability. J. Cell Biol. 105:2167-2177.

28- Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil, J., Svoboda, A., 2003. Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. Oncol. Rep. 10(4):1049-58.

29- Vogt N., Koch I., Schwarz H., Schnorrer F., Nusslein-Volhard C., 2006, The gammaTuRC components Grip75 and Grip128 have an essential microtubule-anchoring function in the Drosophila germline. Development., 133(20):3963-72.

30- Watts, R.G., 1995. Role of gelsolin in the formation and organization of triton-soluble F-actin during myeloid differentiation of HL-60 cells. Blood, 85(8):2212-2221.

31- Zhang, J.W., Wang, J.Y., Chen, S.J., Chen, Z., 2000. Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. J. Biosci. 25(3):275-84.

Archive of SID

www.SID.ir

Immunocytochemical Study of Microtubule Reorganization in Induced Differentiated Leukemia Cells by Retinoic Acid

Ahmadian sh., Pazhang Y., and Shafiezadeh M.

Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, Enghelab Ave., University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Microtubules are important components of cell cytoskeleton which participate in mitosis, protein localization and cell signaling. They are also the targets of several anticancer agents which indicating their importance in maintaining cell viability. Capacity of leukemia cells to re-organize their microtubules is considered an integral part of differentiation of these cells to mature granulocytes by all-trans retinoic acid (ATRA), which is an establish drug for treating acute promyelocytic leukemia. In this study we examined alpha- , alpha-acetylated and gamma-tubulin content, their patterns of distribution in the cytoplasm and the potency of centrosomes in reorganizing microtubules in different stages of ATRA-induced differentiation of HL-60 cell line. Results have shown that gamma-tubulin content was increased with a focal centrosomal accumulation of gamma-tubulin following differentiation. Differentiated cells had the ability to re-organize their microtubule network following nocodazole challenge test, whereas undifferentiated cells did not show such ability. Alpha-tubulin was more regularly organized in differentiated cells and acetylated alpha-tubulin generally followed the same organization patterns after differentiation as occurred for alpha-tubulin. Our results is suggestive of a centrosomal, and organized nucleation pattern of microtubules in HL-60 cells following differentiation possibly mediated through upregulation of gamma-tubulin..

Keywords: Microtubule, Differentiation, HL-60, Gamma-tubulin, Immunocyto-chemistry

Archive of SID

www.SID.ir