مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۵/ آذر و دی ۱۳۹۳/ ۴۳-۳۲

مقاله پژوهشی

تمایز عصبی سلول های کار سینومای جنینی P19 بیان کننده ی ژن پروتئین فلوئورسانت سبز به وسیله داروی ضد پارکینسونی دپرنیل

شبنم بخشعلی زاده[1*]، فریبا اسماعیلی[2،3]، هدایت الله شیر زاد[4]، فریبا هوشمند[5]، مرضیه ابراهیمی هفشجانی[6]، ثریا قاسمی[4]

[1] گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛ [2] گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران؛ [3] پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [4] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [5] گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [6] گروه زیست شناسی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۲

چکیده:

زمینه و هدف: **سلول های P19 دودمانی از سلول های کار سینومای جنینی چند استعدادی هستند که قادرند در محیط کشت حاوی سرم رشد نموده و برای تمایز به هر سه دودمان مزودرمی، آندودرمی و اکتودرمی القا شوند. با استفاده از روش های استاندارد ترانسفکشن می توان توالی DNA خارجی را به این سلول ها وارد کرده و عملکرد و تمایز سلولی را بررسی کرد. این تحقیق با هدف القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 ترانسفکت شده با ژن پروتئین فلوئورسانت سبز (GFP) با استفاده از داروی ضد پارکینسونی دپرنیل صورت گرفت.**

روش بررسی: **در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی از روش رسوب کلسیم فسفات جهت وارد کردن پلاسمید pML8 حاوی ژن GFP و ژن مقاوم به پیورومایسین به این سلول ها استفاده شد. سلول ها با استفاده از محیط کشت MEM-A (Minimum Essential Medium Alpha) حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی جنینی کشت داده شدند. در اینجا غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل برای القای تمایز اجسام شبه جنینی به دودمان عصبی استفاده شد. جهت ارزیابی تمایز سلول های P19 بررسی موفولوژی با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی کرزیل ویوله انجام شد. به علاوه برای ردیابی پروتئین های ویژه سلول های عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتاتوبولین III از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد.**

یافته ها: **ضمن تولید سلول های P19 ترانسفکت شده پایدار، تمایز عصبی این سلول ها تحت تأثیر عامل القایی دپرنیل انجام شد. نورون های GFP مثبت مشتق شده از سلول های کار سینومای جنینی نشانگرهای ویژه سلول های عصبی را بیان کردند.**

نتیجه گیری: **سلول های تمایز یافته GFP مثبت می توانند در مطالعات پیوندی و پژوهش های پایه ای مرتبط با سلول درمانی و بیماری های تحلیل سیستم عصبی مورد استفاده قرار گیرند.**

واژه های کلیدی: **سلول های بنیادی کار سینومای جنینی، ژن GFP، تمایز عصبی، سیناپتوفیزین، بتاتوبولین III.**

مقدمه:

سلول های P19 سلول های بنیادی پر استعدادی بوده و مانند سلول های جنینی طبیعی با استفاده از مکانیسم های یکسان تمایز می یابند. وقتی سلول های P19 به جنین های نرمال تزریق شوند، سلول های مشتق شده از P19 بافت های طبیعی مختلفی را ایجاد می کنند (۱). تمایز سلول های P19 می تواند تحت شرایط تیمار با غلظت های متفاوت دارویی القا شود. از جمله این داروهای مؤثر می توان رتینوئیک اسید و دی متیل سولفواکسید را نام برد که در دوزهای مؤثر برای سلول های P19 سمی نبوده و تمایز را با اهداف سلولی

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه علوم پزشکی تهران- گروه آناتومی- تلفن: ۰۹۱۴۴۴۱۴۲۷۹، E-mail:shbakhshalizade@yahoo.com

www.SID.ir

مختلف القا می کنند (۳،۲). در مطالعات پیشین از داروی محافظ عصبی دپرنیل جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 استفاده شده است (۴).

دپرنیل (سلجلین) داروی محافظ عصبی بوده (۵) و ویژگی های فارماکولوژیک منحصر به فردی دارد (۶) دپرنیل به عنوان مهارکننده آنزیم مونوآمینواکسیداز بوده از چند طریق موجب بهبودی علائم بیماری های مربوط به اختلالات عصبی از جمله، پارکینسون و افسردگی می‌شود (۸،۷)؛ بدین صورت که این دارو از طریق جلوگیری از تخریب دوپامین درون زاد، قابلیت دسترسی و فعالیت آن را در جسم سیاه افزایش می دهد (۹). دپرنیل باعث رها شدن مواد مغذی از اعصاب شده و بر آپوپتوز اثر کاهنده دارد و یا آن را متوقف می‌کند (۱۰)، همچنین می‌تواند باعث تغییر بیان ژن و سنتز پروتئین شود (۱۱،۴). این دارو می تواند تمایز سلول های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells) به سلول های عصبی را به طور وابسته به دوز القا کند (۱۱).

نورون ها می توانند به آسانی در محیط کشت از طریق بررسی مورفولوژیکی با عدسی فاز کنتراست تشخیص داده شوند (۱۲). با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال ضد پروتئین های خاص می توان سلول های عصبی را شناسایی کرد (۱۳). بر اساس یک سری از مطالعات پروتئین سیناپتوفیزین نشانگر مولکولی برای غشای وزیکول پیش سیناپسی بوده و در تشکیل وزیکول سیناپسی و اگزوسیتوز (۱۴)، همچنین تنظیم رهاسازی نوروترانسمیترها و شکل پذیری سیناپسی نقش دارد (۱۵). ایزوفرم پروتئین بتاتوبولین III نیز در بیشتر زواید عصبی بافت های بالغ وجود داشته و نشانگر دیگری برای نورون ها است (۱۶). یکی از مزیت های اصلی سلول های P19 این است که می توان DNA خارجی را با استفاده از روش کلسیم فسفات به آسانی به این سلول ها وارد کرد (۱۷).

چندین دهه قبل پروتئین فلورسنت سبز (Green fluorescent protein= GFP)، ژن گزارشگر کدکننده یک مارکر غیر سمی است که در ماهی ژله ای آکورا ویکتوریا کشف شد (۱۸). از ژن گزارشگر GFP در آزمایش های غربال گری دارویی استفاده فراوان شده است (۱۹). همچنین بیان این ژن در سلول های بنیادی کاربرد مهمی در بیولوژی سلول های بنیادی دارد (۲۰).

این تحقیق با هدف القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 ترانسفکت شده با ژن GFP با استفاده از داروی ضد پارکینسونی دپرنیل صورت گرفت.

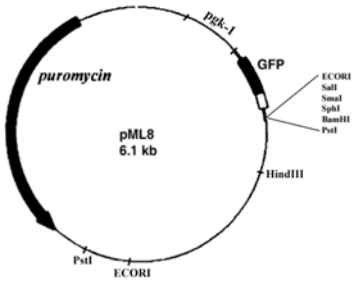
روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی از دودمان P19 سلول های بنیادی جنینی موش استفاده شد. سلول ها به صورت کشت چسبنده از موسسه بانک سلولی پاستور تهران تهیه و در ظروف ۶۰ میلیمتری به تعداد $۱/۵X۱۰^{۶}$ در محیط کشت (Minimum Essential Medium Alpha= MEM-A) (Gibco-BRL, 11900073) حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی جنینی (FBS) (Gibco, 10270)، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر پنیسیلین (Sigma, P3032) و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Sigma, S1277) کشت داده شدند.

جهت انتقال ژن به سلول ها از پلاسمید pML8 (حاملی که ژن GFP و ژن مقاوم به پیورومایسین را تحت کنترل پروموتور Pgk-1 موشی بیان می کند) و از روش رسوب کلسیم فسفات ($CaPO_4$) استفاده شد. این پلاسمید به صورت اهدایی از آزمایشگاه دکتر مک برنی تهیه شده است McBurney's laboratory, Ottawa Regional Cancer (.Center, Ottawa, Canada). غلظت مورد نظر از سلول ها با ۵ میکروگرم پلاسمید ترانسفکت شدند (تصویر شماره ۱). در این روش محلول $CaPO_4$–DNA به صورت قطره قطره بر روی سلول ها اضافه شد. سلول ها سپس به مدت ۷ تا ۹ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO_2 پنج درصد انکوبه شدند. بعد از مدت زمان انکوباسیون محیط کشت با محیط MEM-A تازه جایگزین شد. جهت ترانسفکت پایدار از محیط کشت انتخابی حاوی ۲ میکرو گرم در میلی لیتر پیورومایسین استفاده شد و سلول ها بعد از هشت روز مورد بررسی

www.SID.ir
Archive of SID

قرار گرفتند. سلول های GFP مثبت در روز هشتم بعد از انتقال ژن در سلول های P19 زنده از طریق میکروسکوپ فلورسنس مورد بررسی قرار گرفتند.



تصویر شماره ۱: طرح شماتیک از پلاسمید PML8 که حاوی ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن مقاوم به پیورومایسین است.

جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 بیان کننده GFP، در ابتدا به منظور تولید اجسام شبه جنینی (Embryoid body= EB)، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۵×۱۰۴ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت تهیه و به روش قطره های آویزان کشت شد. سپس این اجسام به میکروپلیت ۱۲ خانه ای ژلاتینه شده محتوی محیط کشت MEM-A حاوی ۳ درصد FBS انتقال یافتند. جهت القای فنوتیپ عصبی در اجسام شبه جنینی حاوی سلول های GFP مثبت از غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل به عنوان گروه تیمار استفاده شد (۴). همچنین دو گروه به عنوان کنترل مثبت، شامل محیط کشت MEM-A فاقد FBS و محتوی غلظت 5×10^{-7} مولار اسید رتینوئیک، و کنترل منفی، شامل محیط کشت MEM-A فاقد دپرنیل و FBS، در نظر گرفته شد.

جهت بررسی موفولوژی سلول های عصبی تمایز یافته از روش رنگ آمیزی کرزیل ویوله استفاده شد. در این روش در ابتدا سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد در دمای اتاق ثابت شدند، سپس در ترکیبی از اتانول ۹۵ درصد و اسید استیک ۵ درصد به مدت بیست دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد آبگیری شده و دو بار هر بار ده دقیقه با بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو داده شدند. بعد از آن سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه با محلول رنگ کرزیل ویوله (محتوی ۰/۲۵ درصد کرزیل ویوله، ۰/۸ درصد اسید استیک گلاسیال، ۰/۶ میلی مولار استات سدیم) (۲۱) انکوبه شده سپس چهار بار هر بار ده دقیقه با PBS شستشو داده شدند.

ایمینوفلورسنس روشی دیگر جهت شناسایی سلول های عصبی در محیط کشت است (۱۲). آنتی بادی های اولیه مورد استفاده در این روش شامل آنتی بادی مونوکلونال ضد سیناپتوفیزین موش (Abcam, San Francisco, CA, ab8049) جهت شناسایی نورون های بالغ، آنتی بادی مونوکلونال ضد بتاتوبولین III موش (Abcam, Cambridge, USA, ab7751) و آنتی بادی پلی کلونال خرگوش برای GFP (Abcam, Cambridge, USA, ab290) بود. ایمونوگلوبولین G (IgG) کونژوگه شده با فلورسئین ایزو تیوسیانات (FITC) ضد موش (Sigma, St. Louis, MO, F9137) و IgG کونژوگه شده با cyanine (Cy5.29) ضد خرگوش (Abcam, Cambridge, USA, ab6564) به عنوان آنتی بادی های ثانویه استفاده شدند. برای انجام ایمینوفلورسنس در ابتدا سلول ها در پلیت های ۱۲ خانه ای حاوی لامل کشت داده شدند. سپس با استفاده از محلول چهار درصد پارافرمالدئید نیم ساعت در درجه حرارت اطاق تثبیت شده و بعد از آن سه بار با محلول PBS ایمنوهیستوشیمی شستشو داده شدند. از محلول بلاک کننده برای پوشاندن جایگاه آنتی ژن های غیر اختصاصی استفاده شد، به طوری که جهت ایجاد نفوذ پذیری، سلول ها به مدت نیم ساعت با محلول ۰/۳ درصد تریتون X-100 در PBS و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و پس از سه بار شستشو با PBS، انکوباسیون سلول ها به مدت نیم ساعت با محلول ده درصد سرم نرمال بز (Sigma, G9023) در PBS انجام شد.

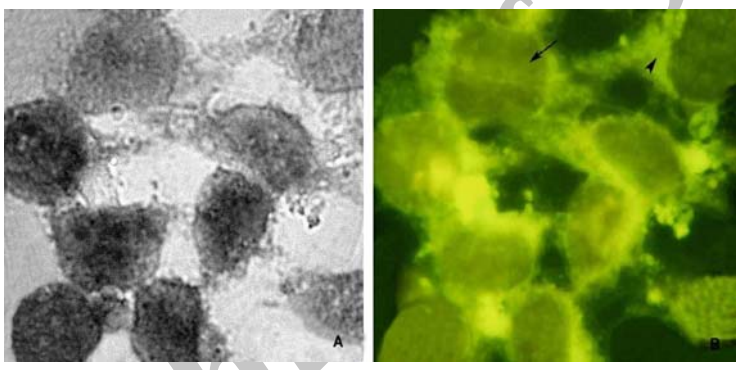
برای انجام ایمنوفلورسنس دوبل در ابتدا سلول ها به طور همزمان با دو آنتی بادی اولیه (ضد

Archive of SID
www.SID.ir

GFP و ضد سیناپتوفیزین یا ضد GFP و ضد بتاتوبولین III) به مدت یک ساعت و سپس با آنتی بادی های ثانویه مناسب به مدت نیم ساعت انکوبه شدند. سلول ها بعد از چسباندن با گلیسرول ۷۰ درصد در محلول PBS با میکروسکوپ ایمنوفلورسنس مشاهده شدند. جهت اطمینان از درستی نتایج حاصله، در نمونه های کنترل آنتی بادی های اولیه حذف شدند.

یافته ها:

با استفاده از روش استاندارد رسوب فسفات کلسیم، DNA پلاسمید PML8 به سلول های بنیادی P19 وارد شد. جهت انتخاب و تکثیر کلون های ترانسفکت شده از آنتی بیوتیک پیورومایسین استفاده شد. سلول های ترانسفکت شده بعد از هشت روز به راحتی با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شدند. سلول های تمایز نیافته P19 ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن گزارشگر پروتئین سبز فلورسنت حاوی هسته درشت و گرد بوده و نسبت سیتوپلاسم به هسته کم است. ژن GFP در بخش سیتوپلاسم سلول های تمایز نیافته بیان می شود. سلول های ترانسفکت شده پایدار برای مقاصد بعدی مورد استفاده قرار گرفت (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره۲: طرح سلول های تمایز نیافته P19 ترانسفکت شده با پلاسمید حاوی ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP)

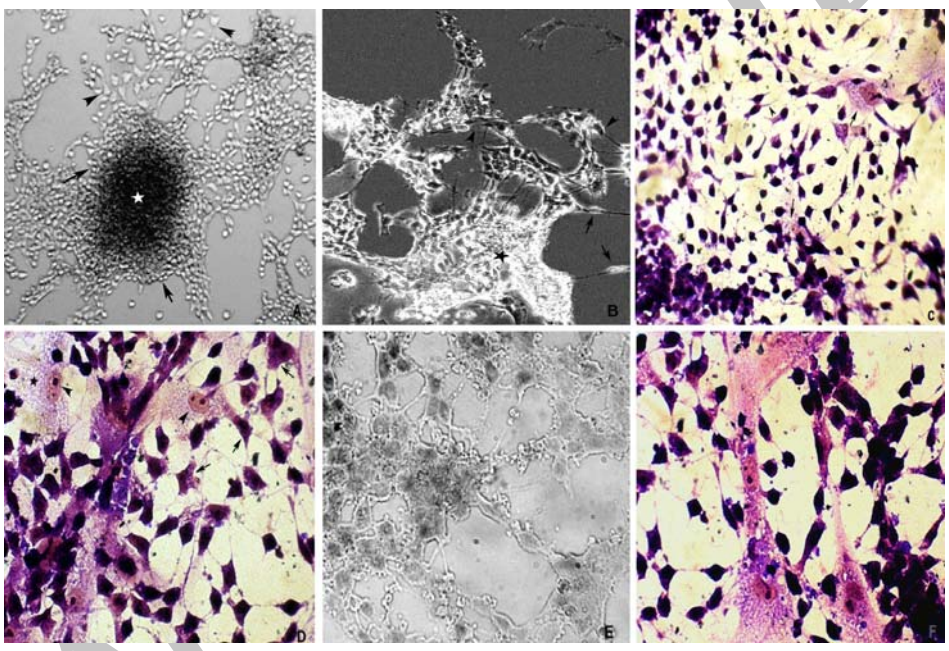
(A) تصویر میکروسکوپ نوری از سلول های P19 ترانسفکت شده. (B) تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول های P19 ترانسفکت شده. سلول ها حاوی هسته درشت و گرد بوده و نسبت سیتوپلاسم به هسته کم است. سیتوپلاسم سلول ها (سر فلش) به خوبی بیان پروتئین GFP را نشان می دهد. هسته (پیکان) و سیتوپلاسم (سر پیکان) سلول ها در هر دو تصویر کاملاً مشخص است (X ۱۰۰).

اجسام شبه جنینی (EB) پس از کشت در ظروف کشتی که کف آن ها ژلاتینه شده بود به بستر کشت چسبیده و سلول های در حال تکثیر به صورت شعاعی از اطراف آن ها بیرون زدند (تصویر شماره ۳، A). تکثیر سلولی در اطراف EB به صورت شعاعی تا حدود ده روز پس از تیمار با دپرنیل ادامه داشت. در طول این مدت هیچ گونه مورفولوژی عصبی در بین سلول های حاصله مشاهده نشد. این سلول ها شبیه سلول های اپی تلیالی یعنی تخت و چند وجهی بوده، بدون هیچ گونه فاصله و به طور فشرده در کنار یکدیگر قرار گرفتند. از حدود روز دهم سلول های ناحیه محیطی دچار تغییر شکل شده و سلول های دوکی شکل را به وجود آوردند. در این سلول ها زواید سلولی که از سمت جسم سلولی به طرف خارج کشیده می شدند قابل تشخیص بود. این سلول ها سپس مجدداً دچار تغییر شکل شده، مورفولوژی سلول های عصبی را به خود گرفتند. تکثیر و تمایز سلولی در محیط کشت تا حدود یک ماه ادامه داشت. به این ترتیب در اطراف هر EB شبکه بسیار وسیعی از سلول های شبه عصبی تشکیل شد (تصویر شماره ۳، A و B). پس از رنگ آمیزی با

www.SID.ir

کرزیل ویوله، سلول های شبه عصبی همراه با زواید سلولی خود به رنگ بنفش درآمدند (تصویر شماره ۳، C). رنگ آمیزی کرزیل ویوله برای ردیابی اجسام نیسل در سیتوپلاسم سلول های عصبی نیز استفاده شد (تصویر شماره ۳، D). همچنین سلول های P19 را که با هیچ دارویی تیمار نشدند، به عنوان کنترل منفی (تصویر شماره ۳، E) و نورون های مشتق شده از سلول های P19 تحت اثر القایی رتینوئیک اسید با غلظت 5×10^{-7} مولار به عنوان کنترل مثبت (تصویر شماره ۳، F) استفاده شدند.

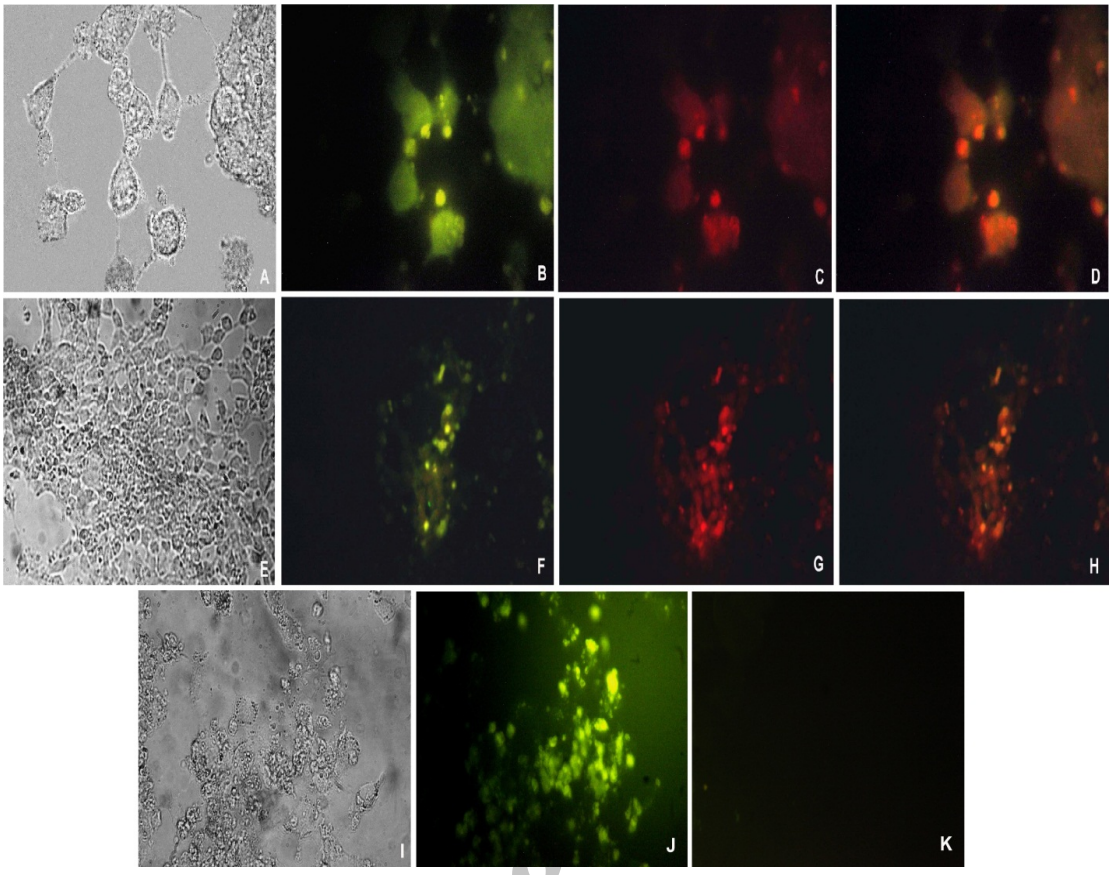
ارزیابی ایمنوفلورسنس سلول های P19 تمایز یافته GFP مثبت نشان داد که این سلول ها بعد از تیمار با دپرنیل نسبت به سیناپتوفیزین (تصویر شماره ۴، B) و بتاتوبولین III (تصویر شماره ۴، F) واکنش ایمنی نشان می دهند. نتایج نشان داد که بسیاری از سلول ها سیناپتوفیزین و GFP (تصویر شماره ۴، D) یا بتاتوبولین III و GFP (تصویر شماره ۴، G) را به طور همزمان بیان کرده اند.



تصویر شماره ۳: بررسی مورفولوژی سلول های P19 تمایز نیافته به صورت اجسام شبه جنینی و سلول های تمایز یافته تحت تأثیر دپرنیل.

(A) تصویر سلول های P19 تمایز نیافته به صورت اجسام شبه جنینی که به بستر کشت چسبیده اند. ستاره جسم شبه جنینی را نشان می دهد. پیکان و نوک پیکان به ترتیب سلول های تمایز نیافته چند وجهی و سلول های دوکی شکل در حال تمایز را نشان می دهند. (B) تصویر میکروسکوپ نوری از تمایز اجسام شبه جنینی (EB) در حضور دپرنیل. نورون ها توده های متراکمی تشکیل داده اند که در بین آن ها نواحی از جسم سلولی نورونی با تراکم کمتر دیده می شود (پیکان). توده های سلولی توسط زواید باریکی به هم متصل شده اند (نوک پیکان). ستاره توده ای از EB های در حال تمایز را نشان می دهد. (C) کرزیل ویوله برای رنگ آمیزی نورون های تمایز یافته استفاده شد. سلول های شبه عصبی شبکه سلولی بر روی سطح تک لایه سلولی را تشکیل دادند (پیکان). سر پیکان انشعابات سلول های شبه عصبی را نشان می دهد. (D) سلول های شبه عصبی در سیتوپلاسم خود حاوی اجسام نیسل هستند (پیکان). علامت ستاره سلول ها ی غیر عصبی با هسته و هستک مشخص را نشان می دهد (سر پیکان). (E) سلول های P19 که با هیچ دارویی تیمار نشدند، به عنوان کنترل منفی و (F) نورون های مشتق شده از P19 تحت اثر القایی رتینوئیک اسید به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. (A- C و E) × ۱۰، (D و F) × ۴۰.

www.SID.ir



تصویر شماره ۴: ارزیابی بیان پروتئین های ویژه عصبی در سلول های تمایز یافته به روش ایمنوفلورسنس.

(A) سلول های P19 تمایز یافته پروتئین فلوئورسانت سبز (GFP) مثبت را با استفاده از نور مرئی، (B) بیان نشانگر عصبی سیناپتوفیزین در سلول های تمایز یافته، (C) بیان همزمان GFP در همان سلول ها، (D) تصویر ممزوج شده، (E) سلول های P19 تمایز یافته GFP مثبت با استفاده از نور مرئی، (F) بیان نشانگر عصبی بتا توبولین III در سلول های تمایز یافته، (G) بیان همزمان GFP در همان سلول ها، (H) تصویر ممزوج شده، (I-K) نمونه کنترل منفی. سلول های P19 تیمار نشده که به وسیله ژن GFP ترانسفکت شده اند؛ ولی در معرض دپرنیل قرار نگرفته اند. این سلول ها نشانگرهای اختصاصی عصبی را بیان نمی کنند. (A- D) ۴۰ ×، (E- K) ۱۰ ×.

Archive

بحث:

در مطالعه حاضر از پلاسمید PML8، جهت ترانسفکت پایدار دودمان P19 از سلول های بنیادی تراتوکارسینومای جنینی موش استفاده شد. این پلاسمید حامل ژن GFP و ژن مقاوم به پیورومایسین است و این ژن ها را تحت کنترل پروموتور pgk-1 بیان می کند. بیان GFP در سلول های ترانسفکت شده از طریق میکروسکوپ فلورسنس رؤیت شد. سپس سلول های P19 بیان کننده GFP با استفاده از داروی محافظ عصبی (دپرنیل)، به سلول های عصبی تمایز یافتند. در واقع دپرنیل به عنوان ماده القاگر جهت تمایز فنوتیپ شبه عصبی در این سلول ها استفاده شد. در طول تمایز عصبی القا شده توسط دپرنیل تغییرات بیولوژیکی و مورفولوژیکی ایجاد می شود. نورون های ایجاد شده در محیط کشت خصوصیات ظاهری عصبی را نشان داده و تعدادی از نشانگرهای عصبی مثل سیناپتوفیزین و بتاتوبولین III را بیان کردند. رنگ آمیزی کرزیل ویوله و ایمنوفلورسنس جهت تأیید فنوتیپ عصبی در سلول های P19 بیان کننده GFP انجام شد. کشت

www.SID.ir

سلول های عصبی بیان کننده GFP به مدت بیش از یک ماه ادامه یافت. در این مطالعه برای اولین بار تمایز عصبی در سلول های بیان کننده GFP مشتق شده از سلول های بنیادی تراتوکارسینومای جنینی P19 انجام شد.

دودمان های سلولی کار سینومای جنینی در صورتی که با تراکم بالا کشت داده شوند (۲۲) یا به صورت توده در آیند (۲۳)، تمایز پیدا می کنند. از مهمترین ویژگی های سلول های P19 که آن ها را برای مطالعات تکوینی مناسب ساخته این است که این سلول ها علاوه بر اینکه به آسانی رشد کرده و فنوتیپ تمایز نیافته خود را حفظ می کنند، در عین حال آن ها می توانند برای تمایز از طریق دستکاری های شرایط محیط کشت القا شوند. در نهایت ترکیب ژنتیکی این سلول ها می تواند به آسانی از طریق انتخاب کلون های حامل ژن های ترانسفکت شده به ژنوم آن ها دست ورزی شده و به این صورت جهت بررسی مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گیرند (۱۷).

در مطالعه حاضر سلول های تراتوکارسینومای P19 توسط حامل حاوی ژن GFP ترانسفکت شدند. در این مطالعه جهت انتخاب و تکثیر کلون های ترانسفکت شده پایدار GFP مثبت از آنتی بیوتیک پیورومایسین استفاده شد. کشت سلول های عصبی بیان کننده GFP به مدت بیش از یک ماه ادامه یافت. سلول های GFP مثبت چندین بار به طور موفقیت آمیزی منجمد و ذوب شدند. نتایج این گزارش نشان داد که ایجاد سلول هایی که به طور طولانی مدت ژن GFP را بیان کنند امکان پذیر است.

کارایی ترانسفکشن پایدار شاخص موفقیت برای انتقال و ادغام ژن به درون سلول هاست (۲۰). در بسیاری از مطالعات پروتئین فلورسنت سبز (GFP) به عنوان مارکر غیر سمی زنده برای کلون های ترانسفکت شده استفاده شده است که نمونه هایی از این مطالعات در مقاله حاضر ذکر شده است (۲۵،۲۴،۱۸،۱۲). با این حال برخی از پژوهش ها غیر سمی بودن GFP برای سلول ها را نغض می کند؛ به طوری که در این مطالعات ایجاد رده های سلولی که به طور طولانی مدت ژن GFP را بیان کنند، ناموفق بوده است و بیان GFP باعث افزایش میزان آپاپتوز در این سلول ها می شود (۲۷،۲۶). به تازگی تقی زاده و همکارانش به سلول هایی دست یافتند که به طور گذرا ژن GFP را تا ۹۶-۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن بیان کردند؛ اما با توجه به اثرات سمیت سلولی GFP آن ها قادر به گسترش این کلون های سلولی به عنوان رده های سلولی بیان کننده پایدار و طولانی مدت GFP نشدند (۲۰). همچنین در مطالعه ای دیگر نیز نشان داده شد GFP باعث بالا رفتن حساسیت به داروهای سایتوتوکسیک و افزایش استرس اکسیداتیو در دودمان سلولی نوروبلاستوما می شود (۲۸). از طرفی Blair و همکارانش اظهار داشتند که GFP یک نشانگر غیر سمی را کد می کند (۲۹).

همچنین در مطالعه دیگر موج بافان و همکارانش از سلول های P19 جهت بیان پایدار EGFP متصل به سیگنال (Peroxisomal Targeting Signal Type II= PTS2) استفاده کردند و توانستند با استفاده از روش لیپوفیکشن رده سلولی پایدار از سلول های P19 تولید کننده PTS2- EGFP ایجاد کنند (۲۴). در مطالعه حاضر با وجود تناقض بین سمی بودن و غیر سمی بودن GFP که در مطالعات پیشین ذکر شد، با استفاده از وکتور حاوی ژن GFP انتقال پایدار و طولانی مدت ژن GFP به دودمان P19 از سلول های بنیادی تراتوکارسینومای جنینی موش صورت گرفت. از آنجایی که سلول های P19 دریافت کننده های عالی در انتقال DNA از طریق روش های کلسیم فسفات یا الکتروپوریشن هستند (۱۷)، تفاوت بین نتایج ما و آنچه که در مطالعات تقی زاده و همکارانش به دست آمده است، ممکن است به علت دودمان های مختلف سلول های بنیادی مورد مطالعه و همچنین استفاده از روش های متفاوت جهت انتقال ژن باشد. نتایجی که ما در ارتباط با بیان پایدار و طولانی مدت GFP مشاهده کردیم مشابه نتایجی است که در مطالعه موج بافان و همکارانش ذکر شد با این تفاوت

www.SID.ir

Archive of SID

که ما در مطالعه خود از روش رسوب کلسیم فسفات جهت انتقال ژن مورد نظر استفاده کردیم.

همانگونه که قبلاً اشاره کردیم تمایز سلول های P19 می تواند تحت شرایط تیمار با غلظت های متفاوت داروئی القا شود (۳،۲). به عنوان مثال هنگامی که این سلول ها با رتینوئیک اسید تیمار شوند، به نورواکتودرم تمایز پیدا کرده و محیط کشت حاوی نورون ها و سلول های گلیا می شود (۳۰). در مطالعات قبلی از داروی محافظ عصبی دپرنیل جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول های P19 استفاده شد (۴). مصرف مداوم داروی دپرنیل فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک را تسهیل می‌کند. همچنین اتورسپتورهای دوپامین را مهار کرده، مانع جذب مجدد دوپامین توسط این نورون‌ها می‌شود (۳۱).

از آنجایی که دپرنیل بیان ژن های نوروتروفین و تمایز نورونی را القا می کند، ممکن است همان اثر را روی سلول های بنیادی جنینی داشته باشد (۱۱). تمایز عصبی سلول های تراتوکارسینومای P19 در شرایط آزمایشگاهی در چندین مطالعه گزارش شده است (۳۲،۱۲). علاوه بر آن نورون های مشتق شده از این دودمان سلولی به طور موفقیت آمیزی در مطالعات پیوندی در مدل های موشی متعددی استفاده شده است (۳۳). مورفولوژی توصیف شده در سلول های عصبی حاصل از این پژوهش پیش از این نیز توسط محققین دیگر گزارش شده است (۳۴). این مورفولوژی به عنوان معیار اولیه شناسایی سلول های عصبی در نظر گرفته شد. در این پژوهش زوائد موجود در نورون های ایجاد شده منشعب شده و با زواید سلولی نورون های مجاور، شبکه به هم پیوسته ای را به وجود آوردند؛ این سلول ها دارای جسم سلولی دو قطبی تا چند قطبی، زواید سیتوپلاسمی گسترده، هسته یوکروماتین و بزرگ محتوی یک هستک و سیتوپلاسم دانه دار بودند. در پژوهش دیگر نورون های حاصل از سلول های P19 تیمار شده با اسید رتینوئیک در ابتدا بر اساس شکل خاص خود شناسایی شدند (۳). زواید سلولی این نورون ها منشعب شده و با زواید سلولی نورون های مجاور شبکه به هم پیوسته ای را به وجود آوردند (۳).

نتایج این مطالعه نشان داد که دپرنیل می تواند پروتئین های نشانگر عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتاتوبولین III، را در سلول های تمایز یافته GFP مثبت بیان کند. بر اساس گزارش های قبلی نورون های مشتق شده از سلول های بنیادی جنینی و سلول های کارسینومای جنینی در شرایط آزمایشگاهی تشکیل سیناپس داده و نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان می دهند (۳۵،۱۱،۴).

در این پژوهش تشکیل سیناپس بین نورون های مشتق شده از سلول های P19 بیان کننده GFP در محیط کشت توسط واکنش ایمنی این سلول ها نسبت به سیناپتوفیزین نشان داده شده است. سیناپتوفیزین پروتئین غشایی وزیکول پیش سیناپسی بوده (۳۶) و محل فعالیت آن در سلول عصبی به صورت نقاطی قابل تشخیص است (۳۲). بیان سیناپتوفیزین در این سلول ها نشانگر اکتساب سیناپس های عملکردی و کارآمد (۳۷) و همچنین توانایی تولید پتانسیل عمل (۳۸) در این سلول هاست. بنابراین می توان نتیجه گرفت که سلول های تولید شده در اثر دپرنیل سلول های عصبی کارآمدی هستند. این پروتئین یکی از مهمترین پروتئین های سیناپسی است که مطالعات فراوانی در مورد آن انجام شده است. سیناپتوفیزین از نشانگرهای معتبر مراحل نهایی تمایز عصبی است (۳۹). در مطالعه ای وجود سلول های بیان کننده سیناپتوفیزین تحت اثر القایی رتینوئیک اسید در حدود ده روز (۲۱) و یا دوازده تا چهارده روز (۴۰) پس از کشت چسبنده EB های حاصل از سلول های ES گزارش شده است. بر اساس گزارش های دیگر نورون های مشتق از سلول های P19 در شرایط آزمایشگاهی سیناپس هایی تشکیل دادند که نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان می دهند (۳۵). بیان این پروتئین با تشکیل سیناپس مرتبط است

www.SID.ir
Archive of SID

(۳۵). مطالعات پیشین نشان داد کاهش فعالیت سیناپسی اثرات مخربی روی سیناپس ها و حافظه دارد (۴۱). روش درمانی که در آن ارتباطات سیناپسی بین نورون ها بازیابی یا حذف می شود می تواند کاربرد بالقوه مناسبی در درمان بیماری آلزایمر باشد (۴۲). بیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که تیمار ریواستیگماین در مدل کشت سلول قشری اولیه به تنهایی نمی تواند نورون ها را حفظ کند؛ اما مورفولوژی عصبی و نشانگرهای سیناپسی را حفظ می کند. این سیناپس ها جهت عملکرد طبیعی نورون حیاتی هستند (۴۲). همچنین گزارش شده است لیتیم کلراید، سطح mRNA ی ژن های کد کننده سیناپتوفیزین و پروتئین نوروفیلامنت ۱۶۰ کیلودالتونی را افزایش می دهد (۴۳). در پژوهش حاضر نشان داده شد که سلول های تمایز یافته نسبت به بتاتوبولین III واکنش ایمنی مثبت نشان دادند. بتاتوبولین III در بیشتر زواید عصبی بافت های بالغ وجود داشته و نشانگری قدیمی برای نورون های در حال تمایز است (۴۴). بیان بتاتوبولین III ویژه مغزی در نورون ها ی مشتق شده از سلول های بنیادی در مطالعات قبلی نشان داده شده است (۴۵).

نتیجه گیری:

در پژوهش حاضر طراحی ساده و کار آمدی پیشنهاد شده است که می تواند به عنوان پایه ای برای مطالعات تمایز عصبی در شرایط آزمایشگاهی و شرایط محیط زنده در نظر گرفته شود. در واقع در اینجا ترکیبی از روش تشکیل اجسام شبه جنینی و استعمال دارو جهت القای سلول های P19 بیان کننده پایدار GFP به سمت سلول های عصبی استفاده شد. سلول های تمایز یافته GFP مثبت حاصل از این پژوهش سپس در مطالعات پیوندی مورد استفاده قرار گرفت (نتایج گزارش نشده است). استفاده از سلول های بنیادی نشاندار شده با GFP قبل از پیوند امید تازه ای برای استفاده از آن ها در پژوهش های پایه ای فراهم کرده است (۲۵). بنابراین مطالعه حاضر احتمالاً گامی در پیشبرد پژوهش های مرتبط با روش سلول درمانی و بیماری های تحلیل سیستم عصبی با استفاده از سلول های بنیادی تراتوکار سینومای P19 فراهم آورده است.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شده است. بدینوسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند به ویژه جناب آقای دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری، رئیس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، قدردانی می شود.

منابع:

1. Rossant J, McBurney MW. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. J Embryol Exp Morph. 1982; 70(1): 99-112.
2. McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. Dev Biol. 1982; 89(2): 503-8.
3. Jones-Villeneuve EM, McBURNEY MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. J Cell Biol. 1982; 94(2): 253-62.
4. Bakhshalizadeh, S, Esmaeili, F, Houshmand, F, Shirzad H, Saedi M. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011; 47(8): 550-7.

Archive of SID
www.SID.ir

5. Fedchenko V, Globa A, Kaloshin A, Kapitsa I, Nerobkova L, Val'dman E, et al. The effect of short-term administration of (-)-deprenyl and isatin on the expressions of some genes in the mouse brain cortex. Med Sci Monit. 2008; 14(12): 269-73.
6. Knoll J. History of deprenyl-the first selective inhibitor of monoamine oxidase type B. Vop Med Khim. 1996; 43(6): 482-93.
7. Schulz D, Mirrione MM, Henn FA. Cognitive aspects of congenital learned helplessness and its reversal by the monoamine oxidase (MAO)-B inhibitor deprenyl. Neurobiol Learn Mem. 2010; 93(2): 291-301.
8. Villarinho JG, Oliveira SM, Silva CR, Cabreira TN, Ferreira J. Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. Eur J Pharmacol. 2012; 690(1): 107-14.
9. Gerlach M, Reichmann H, Riederer P. A critical review of evidence for preclinical differences between rasagiline and selegiline. Basal Ganglia. 2012; 2(4): 9-15.
10. Tatton WG, Chalmers-Redman RME, Ju WYH, Wadia J, Tatton NA. Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription. J Neural Transm Suppl. 1997; 49: 245-68.
11. Esmaeili, F, Tiraihi, T, Movahedin, M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. Rejuvenation Res. 2006; 9(4): 475-84.
12. MacPherson PA, McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. Methods. 1995; 7(3): 238-52.
13. Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. Biochem Cell Biol. 2000; 78(5): 613-28.
14. Redecker P, Grube D. Synaptophysin in the nervous system and endocrine cells. Acta Histochem Suppl. 1992; 42: 33-8.
15. Shen YC, Tsai HM, Ruan JW, Liao YC, Chen SF, Chen CH. Genetic and functional analyses of the gene encoding synaptophysin in schizophrenia. Schizophr Res. 2012; 137(1): 14-9.
16. Locher H, De Rooij Ke, De Groot JC, Van Doorn R, Gruis NA, Löwik CW, et al. Class III β-tubulin, a novel biomarker in the human melanocyte lineage. Differentiation. 2013; 85(4): 173-81.
17. McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells. Int J Dev Biol. 1993; 37(1): 135-40.
18. Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nat Methods. 2007; 4(7): 555-7.
19. Pulido SA, et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in Leishmania spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. Acta tropica. 2012; 122(1): 36-45.
20. Taghizadeh RR, Sherley JL. CFP and YFP, but not GFP, provide stable fluorescent marking of rat hepatic adult stem cells. J Biomed Biotechnol. 2008; 2008(1): 1-9.
21. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci. 1995; 108(10): 3181-8.
22. McBurney MW. Clonal lines of teratocarcinoma cells in vitro: differentiation and cytogenetic characteristics. J Cell Physiol. 1976; 89(3): 441-55.
23. Martin GR, Evans MJ. Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. Cell. 1975; 6(4): 467-74.
24. Mojbafan M, et al. Creation of a Stable P19 Cell Line Producing PTS2-EGFP. Journal of Isfahan Medical School. 2010; 28(110): 495-502.
25. Raimondo S, Penna C, Pagliaro P, Geuna S. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. J Anat. 2006; 208(1): 3-12.
26. Liu HS, Jan MS, Chou CK, Chen PH, Ke NJ. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? Biochem Biophys Res Commun. 1999; 260(3): 712-7.
27. Lybarger L, Dempsey D, Franek KJ, Chervenak R. Rapid generation and flow cytometric analysis of stable GFP-expressing cells. Cytometry. 1996; 25(3): 211-20.

www.SID.ir

28. Goto H, et al. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. Molecular Cancer Therapeutics. 2003; 2(9): 911-7.
29. Blair L, Bence-Hanulec K, Marshall J. Green fluorescent protein in the study of neuronal signaling pathways. Curr Protoc Neurosci. 2001; 5: 11-16.
30. Aizawa T, Haga S, Yoshikawa K. Neural differentiation-associated generation of microglia-like phagocytes in murine embryonal carcinoma cell line. Dev Brain Res. 1991; 59(1): 89-97.
31. Knoll J. R-(-)-deprenyl (Selegiline, Movergan) facilitates the activity of the nigrostriatal dopaminergic neuron. J Neural Transm Suppl. 1987; 25: 45-66.
32. Finley MF, Kulkarni N, Huettner JE. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. J. Neurosci. 1996; 16(3): 1056-65.
33. Astigiano S, Damonte P, Fossati S, Boni L, Barbieri O. Fate of embryonal carcinoma cells injected into postimplantation mouse embryos. Differentiation. 2005; 73(9): 484-90.
34. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol. 1995; 168(2): 342-57.
35. MacPherson PA, Jones S, Pawson PA, Marshall KC, McBurney MW. P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro. Neuroscience. 1997; 80(2): 487-99.
36. Hutcheon B, Brown L. A, Poulter M.O. Digital analysis of light microscope immunofluorescence: high-resolution co-localization of synaptic proteins in cultured neurons. J Neurosci Methods. 2000; 96(1): 1-9.
37. Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. Synapse formation during neuron differentiation: an in situ study of the myenteric plexus during murine embryonic life. J Comp Neurol. 2000; 425(3): 369-81.
38. Toda H, Takahashi J, Mizoguchi A, Koyano K, Hashimoto N. Neurons Generated from Adult Rat Hippocampal Stem Cells Form Functional Glutamatergic and GABAergic Synapses in Vitro. Exp Neurol. 2000; 165(1): 66-76.
39. Sortwell CE, et al. Pattern of synaptophysin immunoreactivity within mesencephalic grafts following transplantation in a parkinsonian primate model. Brain Res. 1998; 791(1): 117-24.
40. Okabe S, et al. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev. 1996; 59(1): 89-102.
41. Tampellini D, et al. Effects of synaptic modulation on β-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice. J Neurosci. 2010; 30(43): 14299-304.
42. Bailey JA, Lahiri DK. A novel effect of rivastigmine on pre-synaptic proteins and neuronal viability in a neurodegeneration model of fetal rat primary cortical cultures and its implication in Alzheimer's disease. J Neurochem. 2010; 112(4): 843-53.
43. Schmidt MM, Guan K, Wobus AM. Lithium influences differentiation and tissue-specific gene expression of mouse embryonic stem (ES) cells in vitro. Int J Dev Biol. 2001; 45(2): 421-30.
44. Rak K, et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the neonatal rat cochlear nucleus. Cell Tissue Res. 2011; 343(3): 499-508.
45. Kompisch KM, et al. Neurogenic transdifferentiation of human adipose-derived stem cells? A critical protocol reevaluation with special emphasis on cell proliferation and cell cycle alterations. Histochem Cell Biol. 2010; 134(5): 453-68.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 Dec, Jan; 16(5): 32-43. ***Original article***

Neuronal differentiation of green fluorescent protein expressing P19 embryonal carcinoma cells by deprenyl, an antiparkinson drug

Bakhshalizadeh SH[1*], Esmaeili F[2,3], Shirzad H[4], Houshmand F[5], Ebrahimi-Hafshejani M[6], Ghasemi S[4]

[1] Anatomical Sciences Dept., Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; [2]Biology Dept., Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran; [3]Research Biotechnology Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran; [4]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; [5]Physiology Dept., Faculty of Medical Sciences, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran; [6]Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Received: 9/Sep/2013 Accepted: 24/Sep/2014

Background and aims: P19 cells are a line of pluripotent embryonal carcinoma stem cells, that are able to grow continuously in serum-supplemented media and can be induced to differentiate into all three lineages, mesoderm, endoderm and ectoderm. The sequence of foreign DNA can be introduced into these cells using of standard methods of transfection, through which to examine the cell function and differentiation. This study aimed to induce neuronal phenotype in P19 cells transfected with green fluorescent protein (GFP) gene, using an antiparkinson drug, deprenyl.

Methods: In this laboratory descriptive study, calcium phosphate precipitation method was used to introduce pML8 plasmid, encoding GFP and puromycin resistance gene, into these cells. The cells were cultured using MEM-A medium, supplemented with 15% fetal bovine serum. Here 10^8 M concentrations of deprenyl was used to induce embryoid body differentiation to neuronal lineage. Cresyl violet staining was used to evaluate the morphology of differentiated P19 cells. In addition, immunofluorescence techniques was used to evaluate neuron specific proteins, synaptophysin and β-III tubulin.

Results: In addition to production of stable transfected P19 cells, neuronal differentiation of these cells was carried out by the effect of deprenyl induction. GFP-positive neurons derived from embryonic carcinoma cells expressed neuron specific markers.

Conclusions: GFP-positive differentiated cells can be used in transplantation studies and basic researches in association with cell therapy and neurodegenerative diseases.

Keywords: **Embryonal carcinoma cells; green fluorescent protein gene; Neuronal differentiation; Synaptophysin; β-III tubulin.**

Cite this article as: Bakhshalizadeh SH, Esmaeili F, Shirzad H, Houshmand F, Ebrahimi-Hafshejani M, Ghasemi S. Neuronal differentiation of green fluorescent protein expressing P19 embryonal carcinoma cells by deprenyl, an antiparkinson drug. Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(5): 32-43.

[*]**Corresponding author:**

Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel: 02164053329, E-mail: shbakhshalizade@yahoo.com

www.SID.ir