

افزایش بیان پیش‌ساز پلی‌پتید آمیلوئیدی جزیره‌ای انسانی در سلول‌های CHO و بررسی ویژگی‌های تجمعی آن: مدل کشت سلولی تجمع پروتئین در سلول‌های پستانداران

مریم حسنیلو^۱، حمیدرضا کلهر^{۲*}، مجید صادقی‌زاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۸/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۷

چکیده

هدف: به منظور مطالعه مکانیسم‌های دخیل در فرایند تشکیل آمیلوئیدها، مدل کشت سلولی تجمع پروتئین آمیلین ابداع و ویژگی‌های آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: فیبریل‌های آمیلوئیدی از سلول‌های CHO استخراج شد و تمایل اتصال آن‌ها به رنگ تیوفلاوین T و قرمز کونگو بررسی شد. انکسار مضاعف سبز-زرد فیبریل‌های استخراج شده تحت نور پلاریزه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی بهتر تشکیل آمیلوئید در سلول‌های CHO، پروتئین آمیلوئیدزایی در این سلول‌ها بیش‌بیان شد. بدین منظور توالی ژن ProIAPP به کمک PCR تکثیر و در ناقل بیانی EGFP-N1 ساب کلون شد. سلول‌های CHO با ناقل EGFP-N1-ProIAPP و ناقل EGFP-N1 به‌عنوان شاهد، ترانسفکت شدند. فنوتیپ حدود ۱۰۰ سلول ترانسفکت شده در روزهای مختلف پس از ترانسفکشن به وسیله میکروسکوپ فلورسنت ارزیابی شد. وجود ساختارهای آمیلوئیدی در این سلول‌ها به وسیله رنگ‌آمیزی قرمز کونگو در زیر نور پلاریزه بررسی شد. آزمون حیات سلول به کمک رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو روی این سلول‌ها انجام گرفت.

نتایج: به‌طور طبیعی ساختارهای آمیلوئیدی در مقدار کم، در سلول‌های CHO وجود داشت. به‌علاوه سلول‌های ترانسفکت شده با ProIAPP-EGFP فنوتیپ تجمع را نشان می‌دادند که این فنوتیپ در ریخت‌شناسی‌های گرد به مراتب بیشتر از نوع بیضوی بود.

نتیجه‌گیری: فیبریل‌های آمیلوئیدی در سلول‌های CHO به مقدار کم وجود دارند. پروتئین آمیلین با بیان افزایش یافته در سلول‌های CHO ایجاد فنوتیپ تجمع می‌نماید که از آن می‌توان به‌عنوان مدل کشت سلولی تجمع پروتئین استفاده کرد. ویژگی‌های آمیلوئیدزایی این پروتئین می‌تواند به‌طور گسترده‌ای ما را در مطالعه مکانیسم‌های درگیر در فرایند تشکیل آمیلوئیدها در پستانداران از جمله انسان یاری نماید.

کلیدواژگان: آمیلین، تجمع پروتئین، مدل کشت سلولی

۱- مقدمه

بیماری‌های آمیلوئیدی (Amyloidosis) به بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که در آن پروتئین‌های طبیعی محلول، در داخل یا خارج از سلول به صورت فیبریل‌های نامحلول رسوب می‌کنند و ساختار و عملکرد بافت را دچار اختلال می‌نمایند. در انسان بیش از ۲۰ پروتئین مختلف شناسایی شده است که در فرد بیمار، فیبریل‌های آمیلوئیدی با ساختار صفحات بتای عرضی لایه لایه تشکیل می‌دهند. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease)، هانتینگتون (Huntington's disease) و پارکینسون (Parkinson's disease) و نیز بیماری آمیلوئیدی سیستمیک (Systematic amyloidosis) و دیابت نوع دو (Type 2 diabetes) اشاره کرد [۱].

فیبریل‌های آمیلوئیدی در بیماری‌های مختلف با مکانیسم مشترکی تشکیل می‌شوند. اولین مرحله، دناتوراسیون یا واسرشته شدن (Denaturation) جزئی پروتئین است که در این حالت برای ایجاد تجمع مستعد می‌شوند. پروتئین واسرشته حاصل در حالت طبیعی وارد فرایند سرشته شدن دوباره می‌شود و در صورت عدم موفقیت در این مرحله به چرخه تجزیه وارد می‌شود. در افراد بیمار، پروتئین‌های واسرشته به دلایل کم و بیش ناشناخته‌ای از سیستم کنترل کیفیت سلول فرار کرده و از نواحی آب‌گریز (Hydrophobic) خود به یکدیگر متصل می‌شوند و مولکول‌های حدواسط نیمه پایداری را در ابعاد دایمر تا ذرات میلیون دالتونی بزرگ ایجاد می‌کنند. بعضی از این حدواسط‌ها به صورت تجمعات کروی محلول، با ابعاد تقریبی ۱۰-۳۰ نانومتر در می‌آیند که به آن‌ها تجمعات پیش‌فیبریلی یا پروتوفیبریل (Protofibril) می‌گویند. به نظر می‌رسد که عامل اصلی ایجاد سمیت توسط این پروتئین‌ها، همین ساختارهای حدواسط باشد. مشخص شده است که این ساختارها از راه‌های مختلفی از جمله نفوذپذیر کردن غشا به سلول آسیب می‌رسانند. با گذشت زمان پروتوفیبریل‌ها در کنار یکدیگر قرار گرفته و فیبریل‌های بالغ را تشکیل می‌دهند. فیبریل‌های بالغ دارای ساختار صفحات بتای عرضی‌اند

(Cross β -sheet structure) و به رنگ‌های ویژه از قبیل قرمز کونگو (Congo red)، تیوفلاوین T (Thioflavin T) و تیوفلاوین S متصل می‌شوند که این اتصال به ترتیب موجب ایجاد انکسار مضاعف سبز-زرد و نور فلورسنت در آن‌ها می‌شود که بیانگر ساختار منظم صفحات پروتئینی‌شان است [۲]. یکی از انواع بیماری‌های آمیلوئیدی، بیماری دیابت نوع ۲ یا دیابت غیر وابسته به انسولین است. این بیماری در افراد بالای ۴۰ سال رخ می‌دهد و در مجموع ۹۰ درصد افراد دیابتی را شامل می‌شود. بیش از ۲۰۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند. رسوبات آمیلوئیدی در مبتلایان به دیابت نوع ۲ دیده می‌شود. پروتئینی به نام پلی‌پپتید آمیلوئیدی جزیره‌ای (Islet Amyloid Polypeptide: IAPP) که آن را آمیلین (Amylin) نیز می‌نامند، ماده اصلی تشکیل دهنده آمیلوئیدهای جزیره‌ای در افراد دیابتی را تشکیل می‌دهد [۳].

IAPP، یک مولکول ۳۷ اسیدآمینه‌ای است که در سلول‌های بتای پانکراس ساخته و در گرانول‌های ترشحی پردازش و بسته‌بندی می‌شود. جایگاه ژنی IAPP روی کروموزوم ۱۲ و باند کروموزومی p12.3-p12.1 قرار دارد و به صورت رونوشت ۱/۵ کیلوبازی نسخه‌برداری می‌شود. این رونوشت، پروتئین پیش‌ساز ۸۹ اسیدآمینه‌ای PreProIAPP را که می‌کند که در نهایت با اعمال پردازش‌های مختلف بر روی آن، IAPP بالغ به وجود می‌آید [۴].

در این تحقیق بر آن شدیم تا مدل کشت سلولی پستانداران را به منظور مطالعه فرایند تجمع پروتئین راه‌اندازی کنیم. برای این کار از پروتئین پیش‌ساز آمیلین (ProIAPP) به علت سمیت و آمیلوئیدزایی کمتر آن نسبت به آمیلین استفاده شد [۵]. در ابتدا ژن ProIAPP در اتصال به ژن EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) در ناقل بیانی EGFP-N1 کلون و سپس به سلول‌های CHO (Chinese Hamster Ovary) ترانسفکت شد. اثر بیان این پروتئین در سلول با نمونه کنترل بیان‌کننده EGFP بررسی و مقایسه شد. پروتئین آمیلین در حالت طبیعی در گرانول‌های ترشحی ذخیره و پردازش می‌شود و در نهایت به خارج از

آنزیم‌ها به غیر از موارد اشاره شده از شرکت Fermentas محصول کشور لیتوانی تهیه شده است.

۲-۲- جدا کردن ساختارهای آمیلوئیدی از

سوسپانسیون سلولی

سلول‌های CHO در یک فلاسک ۷۰ سانتی‌متر مربعی کشت داده شد و پس از رسیدن تراکم آن‌ها به ۸۰ درصد به کمک بافر لیزکننده [۲۰ میلی‌مول Tris-HCl (pH=۷/۴)، ۱۴۰ میلی‌مول NaCl، ۱ میلی‌مول فنیل‌متیل‌سولفونیل فلوراید (phenylmethylsulfonyl fluoride)، ۱ میلی‌مول Na₃NO₄، ۱۰ میلی‌مول NaF، ۰/۵ درصد حجمی/حجمی EDTA، ۱ میلی‌مول Nonidet P-40 (v/v) و مهارکننده پروتئاز کامل (Complete protease inhibitors)] لیز و سوسپانسیون حاصل سه بار تحت فرایند ذوب و انجماد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون سلولی حاصل در دور ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و به این ترتیب محتوای هسته را از سوسپانسیون سلولی جدا شد. ابتدا غلظت پروتئین موجود در سوسپانسیون سلولی با آزمون TCA-lowry (Trichloric Acetic Acid lowry assay) سنجیده شد. سپس مایع رویی در دور ۱۰۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در بافر لیزکننده حل و مورد آزمایش اتصال قرمز کونگو و تیوفلاوین T قرار داده شد [۶]. کلیه مواد از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

۲-۳- آزمون اتصال رنگ قرمز کونگو

۵ میکرومول از محلول قرمز کونگو تهیه شده در بافر فسفات پتاسیم با pH=۷/۴ (NaCl با غلظت ۰/۱۵ مول و KH₂PO₄ با غلظت ۵ میلی‌مول) به ۳۶ میکروگرم سوسپانسیون رسوب سلولی، اضافه شد. در یک لوله (Tube) جداگانه مقدار ۵ میکرومول از محلول قرمز کونگو و در لوله دیگری فقط از سوسپانسیون رسوب سلولی به

سلول ترشح می‌شود [۴]. در این تحقیق با حذف پپتید نشانه از انتهای این پروتئین آن را به‌عنوان یک مولکول آمیلوئیدزا در سیتوپلاسم بیان نموده و ریخت‌شناسی (Morphology) ایجاد شده به‌وسیله آن بررسی شد.

ساخت مدل سلولی تجمع پروتئین در سلول‌های پستانداران می‌تواند کمک مؤثری در مطالعات مربوط به برهم‌کنش‌های مولکولی درون سلولی مرتبط با این فرایند باشد. به‌علاوه می‌توان به کمک این مدل تأثیر عوامل مختلف محیطی را در کاهش یا افزایش سرعت تجمع پروتئین به‌دست آورد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساب کلونینگ توالی ProIAPP در ناقل

بیانی EGFP-N1

با طراحی آغازگر (Primer) و قرار دادن نقاط برش آنزیم‌های محدودالتر *XhoI* در آغازگر جلویی (Forward) (CCGCTCGAGATGCCATTGAAAGTCATCAGGTGGA) و *EcoRI* در آغازگر برگشتی (Reverse) (CCGGAATTCTAAGGGCAAGTAATTCAGTGGCTC) توالی ProIAPP از ناقل بیانی باکتریایی pET32-LIC اهدایی دکتر کاپورنیوتو (Kapurniotu) [۴] به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) (۲۵ چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، ۴۷ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه) تکثیر شد. سپس محصول PCR و ناقل EGFP-N1 برش مضاعف شده و پس از تخلیص، فسفات انتهای 5' ناقل به کمک آلکالین فسفاتاز (promega, USA) حذف و واکنش الحاق با نسبت ۳ به ۱ از محصول PCR و ناقل انجام شد. محصول الحاق به درون باکتری اشرشیاکلی DH5 α ترانسفکت و روی محیط آگار جامد کشت داده شد. کلونی‌های مثبت برای تأیید الحاق هضم مضاعف شدند و برای تأیید ترادف کلونینگ توالی‌یابی گشتند که نشان می‌داد کلونینگ با موفقیت انجام شده است. کلیه

موج برانگیختگی (Excitation) آن در ۴۴۰ نانومتر و طول موج نشری (Emission) آن در ۴۸۵ نانومتر تنظیم شده بود، اندازه گرفته شد (عرض اسلاید جذبی و نشری ۵ نانومتر تنظیم شد). عدد حاصل از فلورسنت محلول تیوفلاوین T بدون پروتئین از مقدار فلورسنت نمونه‌ها کسر شد تا فلورسنت زمینه حذف شده باشد [۷].

۲-۶- میکروسکوپ فلورسنت

سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP-N1 و EGFP-N1-ProIAPP در روزهای اول، دوم، سوم و ششم در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و ریخت‌شناسی تعداد تقریبی ۱۰۰ سلول بررسی شد. این آزمایش سه‌بار تکرار و از اعداد حاصل میانگین و انحراف معیار تهیه شد. سپس به کمک نرم‌افزار Excel نمودار تهیه و روی داده‌های آن شاخص خطا قرار داده شد.

۲-۷- رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده

به‌وسیله رنگ قرمز کونگو

ابتدا سلول‌های موجود در لام را به کمک متانول ۱۰۰ درصد تثبیت شد. سپس محلول قرمز کونگو که در اتانول ۸۰ درصد قلیایی تهیه شده بود، روی سلول‌ها ریخته شد. چندین بار در آب فرو برده شد و به‌مدت ۲ دقیقه در هماتوکسیلین قرار داده شد. لام‌ها یک‌بار در اتانول اسیدی ۷۰ درصد، چند بار در آب و یک‌بار در NaOH ۱ درصد فرو برده شد. در انتها در اتانول ۹۵ درصد و سپس ۱۰۰ درصد شستشو، با زایلین تمیز و در زیر نور پلاریزه مشاهده شد [۷].

۲-۸- ترانسفکشن سلول‌های CHO به‌وسیله

ناقل‌های EGFP-N1 و EGFP-N1-ProIAPP

این کار به کمک الیگوفکتامین (Oligofectamine) انجام شد. بدین صورت که مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت

مقدار ۳۶ میکروگرم اضافه شد. حجم همه لوله‌ها به کمک بافر فسفات پتاسیم به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها به‌خوبی مخلوط و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی گذاشته شد و سپس جذب UV آن‌ها در گستره طول موج‌های ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر اسکن شد. در نهایت برای به‌دست آوردن منحنی اصلاح شده هر یک از نمونه‌ها، منحنی مربوط به پروتئین بدون قرمز کونگو هر نمونه از منحنی مربوط به پروتئین همراه قرمز کونگو کم شد [۷]. کلیه مواد از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

۲-۴- رنگ آمیزی رسوبات آمیلوئیدی استخراج

شده از CHO به‌وسیله رنگ قرمز کونگو و

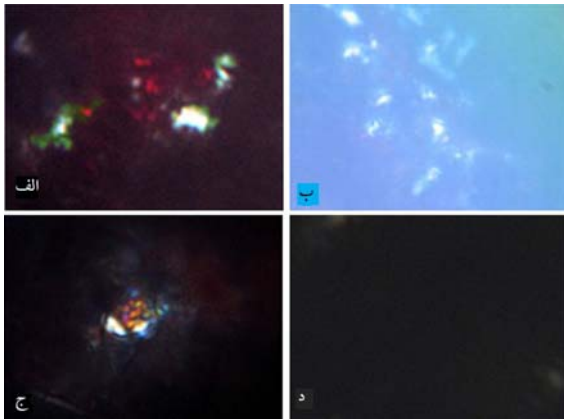
مشاهده انکسار مضاعف آن در زیر نور پلاریزه

۱۰ میکرولیتر از رسوبات آمیلوئیدی استخراج شده روی اسلاید میکروسکوپی قرار داده شد و چند دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد تا خشک شود. محلولی از ۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب دیونیزه تهیه و با NaCl و سپس قرمز کونگو به حد اشباع رسانده شد. محلول حاصل را فیلتر نموده و روی رسوبات آمیلوئیدی ریختیم و پس از چند دقیقه در زیر نور پلاریزه مشاهده شد [۸].

۲-۵- آزمایش اتصال تیوفلاوین T

(Thioflavin T binding assay)

۵ میکرومول از محلول تیوفلاوین T تهیه شده در بافر فسفات سدیم با $\text{pH} = 1/5$ (۵۰ میلی‌مول Na_2HPO_4 ، ۵۰ میلی‌مول NaH_2PO_4) به ۱۰ میکروگرم سوسپانسیون رسوب سلولی، اضافه شد. در یک لوله جداگانه مقدار ۵ میکرومول از محلول تیوفلاوین T اضافه شد. حجم کل نمونه‌ها به کمک بافر فسفات پتاسیم به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌های حاصل ۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و سپس میزان فلورسنت آن‌ها به‌وسیله اسپکتروفتومتری که طول



شکل ۱ رنگ آمیزی تجمعات آمیلوئیدی در رسوبات حاصل از سانتریفیوژ با دور بالا به وسیله رنگ قرمز کونگو؛ تصاویر با بزرگنمایی $1000\times$ تهیه شده اند. الف و ب) تجمعات آمیلوئیدی موجود در رسوب حاصل از لیز سلولی که در زیر نور پلاریزه درخشش سبز-زرد نشان می دهند. ج) کنترل مثبت که در اینجا از فیبریل های لیزوزیم استفاده شد. د) کنترل منفی؛ تصویر ب برای ایجاد وضوح بیشتر با تنظیمات نوری متفاوتی تهیه شده است. تصاویر وجود ساختارهای آمیلوئیدی را در رسوبات حاصل از استخراج آمیلوئید از سلول های CHO نشان می دهد.

رنگ قرمز کونگو در اتصال به این فیبریل ها جذب نوری متفاوتی ایجاد می کند. به این ترتیب که در صورت وجود ساختار آمیلوئیدی بیشتر ارتفاع بیشتر و جابه جایی پیک (Peak) از 480 نانومتر به 500 نانومتر (Red shift) را نشان می دهد [۷]. مقدار رسوبات آمیلوئیدی پس از استخراج از سلول های CHO با استفاده از آزمون اتصال قرمز کونگو اندازه گیری و بررسی شد. شکل ۲ قسمت الف، افزایش ارتفاع و جابه جایی آن را به سمت طول موج بیشتر نسبت به نمونه حاوی قرمز کونگو به تنهایی نشان می دهد که بیانگر وجود ساختارهای آمیلوئیدی در این رسوبات است.

۳-۳- نشر فلورسنت توسط رسوبات سلولی

از آنجایی که قرمز کونگو می تواند با ساختارهایی غیر از آمیلوئید اتصال غیر اختصاصی دهد [۹]، از آزمون تیوفلاوین T برای بررسی این ساختارها استفاده شد که در بسیاری از مطالعات اختصاصیت آن نشان داده شده است [۷].

Opti-MEM و 20 نانوگرم DNA پلاسمیدی و میکرولیتر الیگوفکتامین در یک خانه از پلیت 24 خانه ای ریخته و پس از 20 دقیقه تعداد 3×10^4 سلول به آن اضافه شد. حجم کل به کمک محیط کشت فاقد آنتی بیوتیک به 500 میکرولیتر رسانده شد. پس از 24 ساعت محیط کشت با محیط کشت دارای آنتی بیوتیک تعویض و در زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

۳- نتایج

۳-۱- انکسار مضاعف سبز- زرد در آمیلوئیدهای

استخراج شده از سلول های CHO

از آنجایی که آمیلوئیدها به طور طبیعی در سلول ها یافت می شوند، در ابتدا تصمیم گرفته شد که مقدار آمیلوئیدهای سلولی اندازه گیری شود. به این منظور ساختارهای آمیلوئیدی از سلول استخراج و تحت آزمایش های مختلفی از جمله آزمایش اتصال قرمز کونگو و تیوفلاوین T قرار داده شد. رسوبات آمیلوئیدی در اتصال به رنگ قرمز کونگو انکسار مضاعف سبز- زردی ایجاد می کنند [۷]. برای بررسی رسوبات حاصل از استخراج ساختارهای آمیلوئیدی از سلول های CHO، رسوبات به وسیله رنگ قرمز کونگو رنگ آمیزی شد. در شکل ۱ قسمت الف و ب این انکسار مضاعف سبز- زرد دیده می شود. شکل ۱ قسمت ج نمونه کنترل مثبت است که در این جا از فیبریل های لیزوزیم تهیه شده در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) استفاده شد. شکل ۱-د نمونه کنترل منفی (آب) و فاقد ساختارهای آمیلوئیدی است. این نتایج وجود ساختارهای آمیلوئیدی را در رسوبات حاصل از استخراج آمیلوئید از سلول نشان می دهد.

۳-۲- اتصال رسوبات حاصل از استخراج

آمیلوئید از سلول های CHO به رنگ قرمز کونگو

برای بررسی محتوای آمیلوئیدی محلول های مختلف از آزمون اتصال قرمز کونگو به فیبریل های آمیلوئیدی استفاده می شود.

۳-۴- سلول‌های ترانسفکت شده

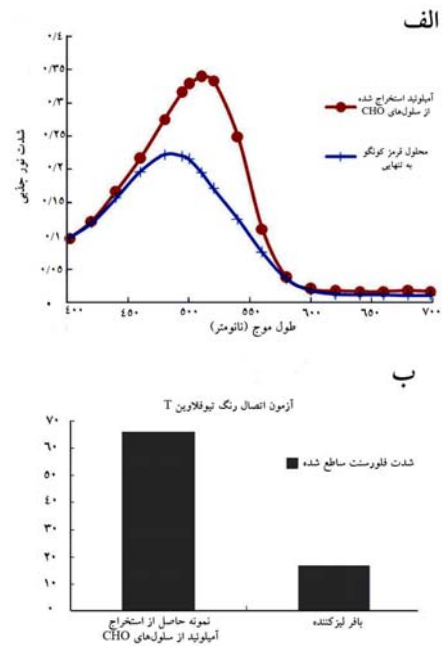
ریخت‌شناسی‌های مختلفی نشان می‌دهند.

به منظور ساخت مدل کشت سلولی تجمع پروتئین، از ترانسفکشن ژن آمیلین که پروتئین تولید شده توسط آن در پانکراس مبتلایان به دیابت نوع دو ایجاد رسوبات آمیلوئیدی می‌کند، به صورت متصل به توالی ژنی EGFP در سلول‌های CHO استفاده شد. به این منظور به عنوان شاهد از ناقل حاوی EGFP برای ترانسفکشن استفاده شد. به طور کلی سلول‌های ترانسفکت شده موجود در پلیت کشت سلول، به یکی از ریخت‌شناسی‌های موجود در شکل ۳ دیده می‌شوند که نمونه‌ای از آن‌ها نشان داده شده است. در هنگام مشاهده سلول‌ها در زیر نور فلورسنت تجمع پروتئین در بعضی از سلول‌ها که به نظر در ابتدای راه ایجاد فنوتیپ تجمع هستند در مناطق مرکزی سلول که احتمالاً اطراف هسته باشد دیده می‌شود. به نظر می‌رسد که تجمع پروتئین در این سلول‌ها از نواحی مرکزی سلول شروع شده باشد (شکل ۴).

۳-۵- با گذشت زمان بر تعداد سلول‌های

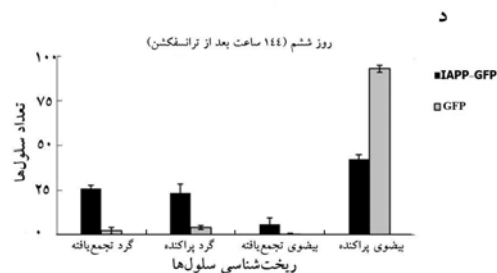
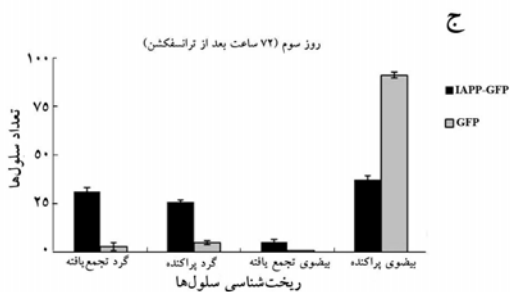
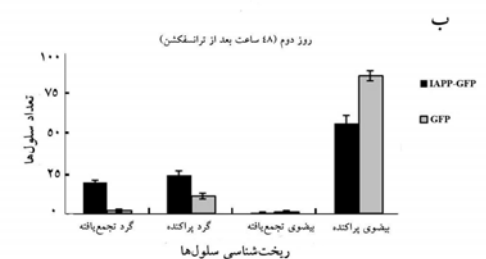
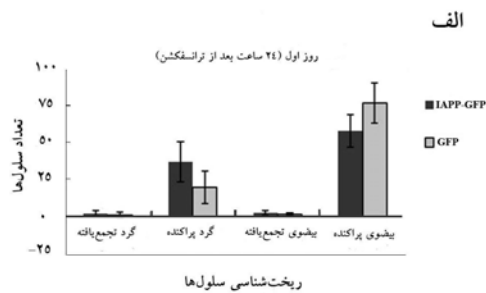
دارای فنوتیپ تجمع افزوده می‌شود.

فنوتیپ سلول‌ها در روزهای اول، دوم، سوم و ششم پس از ترانسفکشن ارزیابی شد. در روز اول (شکل ۵-الف) درصد بالایی از سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP-N1-ProIAPP، فنوتیپ بیضوی پراکنده را نشان می‌دهند و هنوز در جمعیت سلولی فنوتیپ تجمع دیده نمی‌شود. در روز دوم از سلول‌های دارای فنوتیپ بیضوی پراکنده کاسته و بر تعداد سلول‌های دارای فنوتیپ گرد تجمع یافته افزود می‌شود (شکل ۵-ب). این افزایش در روز سوم به اوج خود می‌رسد (شکل ۵-ج). در روز ششم مجدداً از تعداد سلول‌های دارای فنوتیپ گرد تجمع یافته کاسته می‌شود (شکل ۵-د). ریخت‌شناسی تجمع در سلول‌های بیان‌کننده GFP (Green Fluorescent Protein) نیز به مقدار کمی دیده

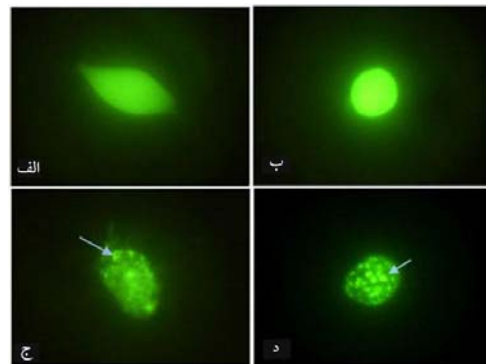


شکل ۲ اتصال رنگ قرمز کونگو و تیوفلاوین T به ساختارهای آمیلوئیدی استخراج شده از سلول‌های CHO، الف) همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، ساختارهای آمیلوئیدی در رسوبات استخراج شده منجر به بالا رفتن شدت نور ساطع شده از قرمز کونگو و جابه‌جایی نمودار به سمت طول موج‌های بالاتر شده است که ویژگی ساختارهای آمیلوئیدی است. ب) نمودار اتصال اختصاصی رنگ تیوفلاوین T به ساختارهای آمیلوئیدی را نشان می‌دهد. مقدار نور ساطع شده با نمونه بافر لیزکننده مقایسه شد. ساختارهای آمیلوئیدی در این نمونه به تیوفلاوین T متصل شده و باعث افزایش شدت نور فلورسنت ساطع شده می‌شود.

رنگ تیوفلاوین T در اتصال به ساختارهای آمیلوئیدی در محدوده طول موج ۴۸۵ نانومتر نور فلورسنت نشر می‌کند. این کار که با کمک طول موج برانگیختگی ۴۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام می‌شود، وجود و میزان ساختارهای آمیلوئیدی را در محلول‌ها نشان می‌دهد. داده‌های شکل ۲ قسمت ب نشر نور فلورسنت در رسوبات حاصل از استخراج آمیلوئید از پروتئین زمینه‌ای سلول‌های CHO را نسبت به بافر مورد استفاده در لیز همین سلول‌ها نشان می‌دهد. معمولاً برای حذف اثر بافر جذب آن را از جذب نمونه مورد نظر کسر می‌کنند. همان‌طور که مشاهده می‌شود افزایش شدت فلورسنت در نمونه رسوبات استخراج شده از سلول، وجود ذاتی تجمعات پروتئینی درون سلولی را در این سلول‌ها نشان می‌دهد.



می‌شود. اما این مقدار بسیار پایین است ولی در روز سوم مقدار آن افزایش می‌یابد. به طور کلی می‌توان گفت که پروتئین ProIAPP در مقایسه با GFP در ایجاد فنوتیپ تجمع نقش دارد و پروتئین GFP تأثیر نامحسوسی ایفا می‌کند.



شکل ۳ ریکت‌شناسی‌های مختلف مشاهده شده در سلول‌های ترانسفکت شده توسط EGFP-N1-ProIAPP: الف) ریکت‌شناسی طبیعی سلول‌های CHO را به صورت بیضوی پراکنده نشان می‌دهد. مشاهده می‌شود که مولکول‌های GFP در سرتاسر سلول به طور یکنواخت پراکنده‌اند. ب) ریکت‌شناسی گرد و پراکنده را نشان می‌دهند که احتمالاً سلول‌ها در حال جدا شدن از کف پلیت و مرگ و یا در حال میتوز هستند. ج) سلول‌ها را به صورت بیضوی تجمع یافته نشان می‌دهد. تعداد سلول‌های دارای این ریکت‌شناسی بسیار کم است. در د) ریکت‌شناسی گرد تجمع یافته دیده می‌شود که درصد بالایی از سلول‌ها را تشکیل می‌دهند. فلش‌ها نقاط تجمع و شدت نور GFP را نشان می‌دهند.



شکل ۴ به نظر می‌رسد که تجمع پروتئین ProIAPP از مناطق مرکزی سلول و احتمالاً از اطراف هسته آغاز می‌شود. الف، ب و ج) در روز سوم پس از ترانسفکشن با میکروسکوپ فلورسنت گرفته شده است.

۳-۶- انکسار مضاعف سبز- زرد در سلول‌های

CHO ترانسفکت شده

برای اطمینان از حضور ساختارهای آمیلوئیدی در سلول‌های ترانسفکت شده آن‌ها با رنگ قرمز کونگو رنگ‌آمیزی شد. میکروسکوپ پلاریزه یکی از ابزارهای تشخیصی مناسب برای شناسایی ساختارهای آمیلوئیدی است. این ساختارها در زیر نور پلاریزه انکسار مضاعف سبز زرد را نشان می‌دهند [۷].

شکل ۵ فراوانی فنوتیپ سلول‌ها در روزهای اول، دوم، سوم و ششم پس از ترانسفکشن. روز اول (نمودار الف) درصد بالایی از سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP-N1-ProIAPP، فنوتیپ بیضوی پراکنده را نشان می‌دهند. در روز دوم از سلول‌های دارای این فنوتیپ کاسته و بر تعداد سلول‌های دارای فنوتیپ گرد تجمع یافته افزوده می‌شود (نمودار ب). این افزایش در روز سوم به اوج خود می‌رسد (نمودار ج). در روز ششم مجدداً از تعداد سلول‌های دارای فنوتیپ گرد تجمع یافته کاسته می‌شود (نمودار د). ریکت‌شناسی تجمع در سلول‌های بیان‌کننده GFP نیز به مقدار کمی دیده می‌شود. اما این مقدار بسیار پایین است ولی در روز سوم مقدار آن افزایش می‌یابد.

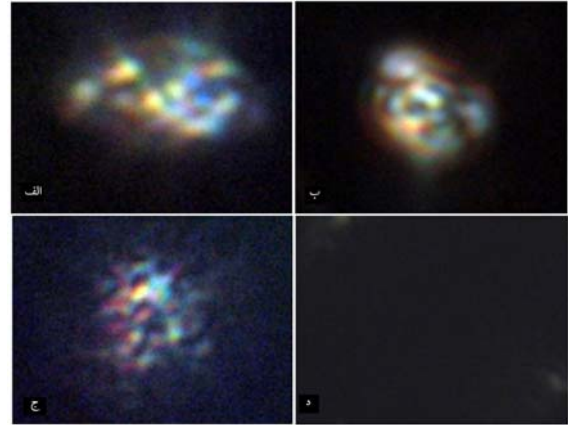
۴- بحث

ساخت مدل کشت سلولی بیماری‌های آمیلوئیدی از اهداف پیش‌روی بسیاری از محققان در سال‌های اخیر بوده است. بانادیوپادیای (Bandyopadhyay) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مدل کشت سلولی تولیدکننده پروتئین تاو (Tau) را به کمک ترانسفکشن سلول‌های HEK-239 (Human Embryonic Kidney cell) با ناقل القایی بیان‌کننده این پروتئین ساختند. یافته‌های این گروه اطلاعات ارزشمندی را در ارتباط با سمیت و مکانیسم عمل این پروتئین که رسوبات آن در سلول‌های عصبی مبتلایان به بیماری آلزایمر وجود دارد، در اختیار دانشمندان قرار داده است [۹]. در سال ۲۰۰۹ لیو (Liu) و همکارانش با خاموش کردن بیان ژن PINK1 (PTEN-Induced putative Kinase 1)، یک سرین ترئونین کیناز میتوکندریایی، متوجه تأثیر افزایش آن در ایجاد تجمعات پروتئین آلفا سینوکلین (Alpha synuclein) در مدل کشت سلولی پارکینسون شدند [۱۰]. به‌طور کلی استفاده از مدل‌های کشت سلولی کمک قابل توجهی به دانشمندان در کسب اطلاعات در زمینه مکانیسم‌های مؤثر در ایجاد تجمعات آمیلوئیدی در انسان می‌کند. به‌علاوه به کمک این مدل‌ها می‌توان تأثیر عوامل مختلف محیطی و سلولی را بر فرایند تجمع پروتئین سنجید.

اوما (Oma) و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تجمع اسیدآمین‌های هوموپلیمر (Homopolymer) سیستئین، لیزین، هیستیدین، آرژینین و تعداد دیگری از اسیدآمین‌ها را در سلول‌های COS-7 به‌وسیله اتصال این اسیدآمین‌ها به توالی پروتئین فلورسنت زرد (Yellow Fluorescent Protein: YFP) و بیان آن تحت پروموتور سایتومگالوویروس (Cytomegalovirus) نشان دادند. طی این تحقیق شدت تجمع و مکان قرارگیری این ساختارها بررسی شد [۱۱].

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که بیان پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید جزیره‌ای می‌تواند منجر به ایجاد فنوتیپ تجمع در سلول‌های CHO شود. به‌علاوه بروز این

در شکل ۶ این انکسار در سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP-N1-ProIAPP مشاهده می‌شود و در نمونه کنترل که سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP هستند، دیده نمی‌شود.

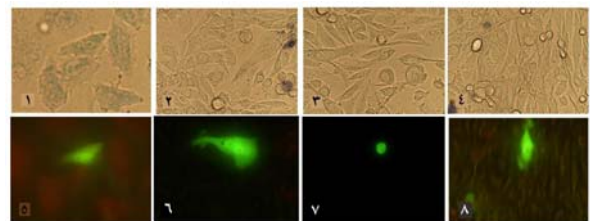


شکل ۶ رنگ‌آمیزی سلول‌ها به‌وسیله رنگ قرمز کونگو؛ تصاویر با بزرگنمایی ۱۰۰۰X تهیه شده‌اند. الف، ب و ج) سلول‌هایی هستند که در زیر نور پلاریزه درخشش سبز-زرد نشان می‌دهند. د) نمایانگر کنترل منفی است.

۳-۷- سلول‌های CHO ترانسفکت شده تا روز

پنجم زنده هستند.

از آنجایی که پروتئین IAPP برای سلول تولیدکننده آن سمی است، به‌منظور اطمینان از زنده بودن، این سلول‌ها با رنگ تریپان‌بلو (Trypan blue) رنگ‌آمیزی شد. این رنگ قادر به ورود به سلول‌های زنده نخواهد بود و فقط هسته سلول‌های مرده را رنگ می‌کند [۸]. این کار در روزهای اول، سوم و پنجم بعد از ترانسفکشن انجام شد که نتایج، زنده بودن سلول‌های گرد و بیضوی ترانسفکت شده را نشان می‌داد. با این حال از تعداد سلول‌ها به شدت کاسته شده بود (شکل ۷).



شکل ۷ رنگ‌آمیزی سلول‌های CHO ترانسفکت شده با رنگ تریپان‌بلو؛ به‌منظور بررسی حیات سلول‌های ترانسفکت شده با EGFP-N1-ProIAPP این سلول‌ها به کمک رنگ تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. این رنگ قادر به رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های زنده نیست.

فوتیپ در روز سوم پس از ترانسفکشن در این سلول‌ها به اوج خود می‌رسد. به نظر می‌رسد که روند ایجاد فوتیپ‌های مختلف در پلیت کشت سلول به‌طور منطقی به ترتیب به صورت ۱- بیضوی پراکنده، ۲- بیضوی تجمع‌یافته و ۳- گرد تجمع‌یافته باشد. به نظر می‌رسد از آنجایی که تعداد ریخت‌شناسی‌های بیضوی تجمع‌یافته نسبت به دیگر ریخت‌شناسی‌ها بسیار کم است، بنابراین می‌تواند فوتیپ گذرایی محسوب شود که سلول بلافاصله پس از رسیدن به آن، ریخت‌شناسی طبیعی خود را از دست می‌دهد و به حالت گرد تجمع‌یافته در می‌آید. در روز ششم نسبت به روز سوم کاهش تعداد سلول‌ها با فوتیپ گرد تجمع‌یافته دیده می‌شود. به نظر می‌رسد که با توجه به کم شدن کلی تعداد سلول‌ها این کاهش به علت مرگ سلول‌ها و جدا شدن آن‌ها از کف پلیت کشت سلول باشد.

به‌طور کلی یکی از عواملی که در ایجاد فرایند تجمع مؤثر شناخته شده است، بیان بالای پروتئین‌ها است. این پروتئین‌ها که در حالت معمول در سلول به‌صورت محلول وجود دارند، در اثر بیان بالا از سرشته شدن (Folding) مناسب بازمانده و دچار تجمع می‌شوند. در این میان توالی‌های پروتئینی که استعداد بیشتری برای تجمع دارند زودتر و با شدت بیشتری این فوتیپ را نشان می‌دهند [۱۲]. مشاهده بروز این فوتیپ در سلول‌های بیان‌کننده GFP نیز می‌تواند به همین دلیل باشد. فولر (Fowler) و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ساختارهای آمیلوئیدی در پروتئین عملکردی Pmel17 که در فرایند ملانین‌سازی سلول‌های پوششی پوست نقش دارد، وجود دارد. این کشف جالب نشان داد که آمیلوئیدها به‌طور طبیعی در سلول‌ها وجود دارند و لزوماً این ساختارها برای سلول سمی نیستند [۱۳]. در این تحقیق به کمک آزمایش اتصال تیوفلاوین و قرمز کونگو مشخص شد که سلول‌های CHO به‌طور ذاتی دارای ساختارهای آمیلوئیدی هستند.

برای تشخیص حضور ساختارهای آمیلوئیدی در محلول به‌طور معمول از آزمون اتصال قرمز کونگو استفاده می‌شود. به این ترتیب که محلولی حاوی پروتئین مورد نظر و قرمز کونگو تهیه و جذب آن را به‌وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در محدوده طول موج ۴۰۰ نانومتر تا ۷۰۰ نانومتر اسکن می‌کنند. مشخص شده است که رنگ قرمز کونگو علاوه بر ساختارهای آمیلوئیدی به‌طور غیر اختصاصی به ساختارهای طبیعی و دسته‌های مختلفی از ساختارهای دوم از جمله ساختار آلفا و آلفا-بتا متصل می‌شود. همچنین مشخص شده است که قرمز کونگو قابلیت الیگومریزاسیون (Oligomerization) پروتئین‌های طبیعی را نیز دارد. بنابراین در هنگام استفاده از این رنگ در تفسیر نتایج باید دقت نمود و در صورت امکان از نمونه کنترل منفی نیز استفاده کرد [۹]. در این تحقیق به علت حساسیت پایین این رنگ، فقط از یک سری از نمونه‌ها برای آزمون اتصال قرمز کونگو استفاده شد و آزمایش اصلی به‌وسیله تیوفلاوین T انجام شد.

به‌طور کلی می‌توان گفت که پروتئین ProIAPP منجر به ایجاد فوتیپ تجمع در سلول‌های CHO می‌شود و پروتئین GFP تأثیر چندانی در ایجاد این فوتیپ ایفا نمی‌کند. از این مدل سلولی می‌توان در مطالعات مربوط به برهم‌کنش‌های مولکولی درون سلولی و بررسی تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با فرایند تجمع استفاده کرد. به‌علاوه برای بررسی تأثیر عوامل محیطی بر تجمع پروتئین نیز می‌توان از این مدل با کمک بررسی مقدار فوتیپ جمعی ایجاد شده نسبت به نمونه کنترل استفاده نمود.

۵- تشکر و قدردانی

به این وسیله از مساعدت‌های خانم دکتر کاپورنیوتو سپاسگزاری می‌کنیم.

۶- منابع

- [1] Hirschfield GM, Hawkins PN. Amyloidosis: new strategies for treatment. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(12): 1608–13.
- [2] Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol Aging* 2006; 27(4): 570–5.
- [3] Jaikaran E, Clark A. Islet amyloid and type 2 diabetes: from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochem Biophys Acta* 2001; 1537(3): 179-203.
- [4] Krampert M, Bernhagen J, Schmucker J, Horn A, Schmauder A, Brunner H, Voelter W, Kapurniot A. Amyloidogenicity of recombinant human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP). *Chem Biol* 2000; 7(11): 855-71.
- [5] Yonemoto IT, Kroon GJ, Dyson HJ, Balch WE, Kelly JW. Amylin proprotein processing generates progressively more amyloidogenic peptides that initially sample the helical state. *Biochemistry* 2008; 47(37): 9900-10.
- [6] Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J. Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. *J Biol Chem* 2007; 282(22): 16454–64.
- [7] Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* 2004; 34(1): 151–60.
- [8] Kluve-Beckerman B, Liepnieks JJ, Wang L, Benson MD. A cell culture system for the study of amyloid pathogenesis. Amyloid formation by peritoneal macrophages cultured with recombinant serum amyloid A. *Am J Pathol* 1999; 155(1): 123-33.
- [9] Khurana R, Uversky VN, Nielsen L, Fink AL. Is Congo red an amyloid-specific dye? *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22715–21.
- [10] Liu W, Vives-Bauza C, Acín-Peréz- R, Yamamoto A, Tan Y, Li Y, Magrané J, Stavarache MA, Shaffer S, Chang S, Kaplitt MG, Huang XY, Beal MF, Manfredi G, Li C. PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and a-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS ONE* 2009; 4(2): e459.
- [11] Oma Y, Kino Y, Sasagawa N, Ishiura S. Intracellular localization of homopolymeric amino acid-containing proteins expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279(20): 21217-22.
- [12] Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med* 2003; 81(11): 678–99.
- [13] Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 2006; 4(1): e6.