

افزایش بقای سلول‌های دوپامین ساز PC12 در برابر سمیت 6-OHDA

با افزایش بیان فاکتور DJ-1

سینا لاسمی^۱، موسی گردانه^{۲*}، پروین اکبری^۱ M.Sc.Student.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
 ۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده پزشکی، دپارتمان سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی، تهران، ایران
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: Mossa65@nigeb.ac.ir , Mossa65@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر DJ-1 بر افزایش بقای سلول‌های دوپامین ساز در برابر سمیت پارکینسونی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا لنتی ویروس‌های نو ترکیب ناقل توام ژن های DJ-1 و گزارش گر Jred تولید شده و برای آلوده سازی سلول‌ها استفاده شدند. بدین منظور سه پلاسمید لنتی ویروسی به نام‌های ناقل، بسته بندی و غشا برای ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T به عنوان رده سلولی مولد ویروس به کار برده شدند. محیط سلول‌های ترانسفکت شده ۲۴ و ۴۸ ساعت جمع آوری و تغلیظ شد تا ذخیره لنتی ویروسی به دست آید. به دنبال ترانسدوکشن سلول‌های دوپامین ساز PC12 با این ذخیره غلیظ ویروسی، سلول‌های مزبور افزایش بیان DJ-1 را آغاز کردند. پس از تیمار این سلول‌ها با توکسین 6-OHDA، میزان بقای آن‌ها در مقایسه با شاهد اندازه گیری شد.

نتایج: مراحل ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T و آلودگی سلول‌های PC12 با ذخیره ویروسی به طور موفقیت آمیز به انجام رسید، زیرا بیان ژن گزارش گر Jred با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس در هر دو مرحله مشاهده شد. سپس افزایش بیان DJ-1 با تکنیک RT-PCR اثبات شد. آزمایش‌های بعدی نشان داد که افزایش بیان DJ-1 باعث افزایش چشم‌گیری در بقای سلول‌های PC12 در برابر سمیت ناشی از 6-OHDA می‌شود. درصد بقای سلول‌های PC12 که افزایش بیان DJ-1 داشتند، در حدود ۳۰ درصد بیشتر از درصد بقای سلول‌های کنترل برآورد شد و این افزایش از نظر آماری معنی دار بود.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن DJ-1 در سلول‌های دوپامین ساز PC12 مقاومت و بقای این سلول‌ها را در برابر سمیت نورونی 6-OHDA به طور معنی دار و چشم‌گیری افزایش می‌دهد.

واژگان کلیدی: پارکینسون، DJ-1، سلول دوپامین ساز، حفاظت نورونی

مقدمه

آسیب پذیر شدن سیستم‌های عصبی ویژگی بارز بیماری‌های دژنراتیو مغزی وابسته به سن می‌باشد. از جمله این بیماری‌ها Parkinson's disease (PD)، Huntington's disease (HD) و Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) را می‌توان نام برد (۱). بخش وسیعی از تحقیقات بر روی استرس اکسیداتیو متمرکز شده است که عامل تباهی و زوال نورون‌ها در این بیماری‌ها می‌باشد. گونه‌های واکنش گر اکسیژن مانند آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و هیدروژن پروکسید در جریان متابولیسم شدن اکسیژن به‌عنوان محصولات فرعی در سلول‌ها تولید می‌شوند که از جمله مهم‌ترین عوامل آسیب رسان به نورون‌ها می‌باشند (۱).

بیماری پارکینسون (PD) یک بیماری وابسته به سن است که در آن با پیشرفت سن، زوال سلول‌های دوپامین ساز رخ داده و نشانه‌های بیماری بروز می‌کند. تقریباً ۹۰ درصد کل نورون‌های دوپامین ساز مغز در بخش شکمی مزنسفالون قرار گرفته‌اند (۲). در پستانداران نورون‌های دوپامین ساز مزونسفالیک (Mes-Daergic) در سه زیرناحیه ی متمایز مغز مستقر می‌شوند: Ventral Substantia nigra pars compacta (SNpc)، tegmental area (VTA) و Retrorubral field (RRF) (۳). شاخص‌ترین تقسیم بندی مسیرهای دوپامین ساز، مسیر نیگرو-استریاتال (SN-ST) است که از SNpc منشأ گرفته و به استریاتوم پشتی که شامل بخش‌های Putamen و Caudate است ادامه می‌یابد (۴).

یکی از ژن‌های مهم دخیل در بروز PD، ژن DJ-1 می‌باشد. DJ-1 در آغاز به‌عنوان یک انکوژن شناسایی شد (۵). سیزده جهش شامل جهش‌های نقطه‌ای و حذفی در ژن DJ-1 در PD شناسایی شده است (۶-۹). DJ-1 عملکردهای متفاوتی دارد از جمله تنظیم رونویسی ژن‌های پایین دست و فعالیت‌های ضد استرس اکسیداتیو. فرض بر این است که نقص در فعالیت‌های ضد استرس اکسیداتیو منجر به بروز PD می‌شود (۱۰-۱۲). بیان DJ-1 در سلول‌هایی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار گرفته اند افزایش می‌یابد. در هنگام افزایش استرس اکسیداتیو آمینو اسید سیستئین در پروتئین DJ-1 در موقعیت ۱۰۶ (C106) اکسیده شده و به این ترتیب گونه‌های واکنش گر اکسیژن (ROS) را از محیط جمع آوری و خنثی می‌کند (۱۳-۱۵). کاهش فعالیت‌های آنتی اکسیدانتی در موارد جهش یافته‌ی DJ-1 در بیماران مبتلا به PD گزارش شده است (۱۷).

بررسی‌های ساختاری و بیوشیمیایی نشان داده اند که DJ-1 به‌صورت همودایمر درمی‌آید و بیشترین کارایی را در فرم همودایمر از خود نشان می‌دهد (۱۴، ۱۶ و ۱۷). این آنالیزها نشان می‌دهند که DJ-1 به‌عنوان پروتئاز (۱۶ و ۱۸) و چاپرون (۱۹ و ۲۰) نیز فعالیت می‌کند. مطالعاتی که بر روی موش‌های فاقد ژن DJ-1 انجام شد نشان داد که فقدان این ژن منجر به از بین رفتن فعالیت گیرنده دوپامین و حساس شدن سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود، این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که نقص عملکرد DJ-1 با PD مرتبط است (۲۱-۲۳). در مطالعات In vivo که بر روی Rat های مدل پارکینسونی انجام شد نشان داد که پروتئین DJ-1 پس از تزریق 6-OHDA مرگ نورون‌های دوپامین ساز را در Substantia nigra مهار کرده، اختلالات رفتاری القا شده با 6-OHDA را بهبود بخشیده و سطح ROS را در سلول‌ها کاهش می‌دهد (۲۴).

در مطالعه جاری، بر آن شدیم که اولاً لنتی ویروس‌های ناقل ژن DJ-1 را به‌طور موفقیت آمیز تولید نمائیم، دوماً با انتقال این ویروس‌ها به‌داخل سلول‌های دوپامین ساز PC12 بیان آن‌را در سلول‌های مزبور افزایش دهیم و ثالثاً تاثیر این افزایش بیان را بر بقای سلول‌ها در برابر سمیت با 6-OHDA بسنجیم.

مواد و روش‌ها

ناقل‌های ویروسی شامل ناقل انتقال، ناقل غشا و ناقل بسته بندی با استفاده از کیت ماکسی پُرپ کیاژن تهیه و تخلیص شدند. سلول‌های HEK-293T از آزمایشگاه KL OMALLEY از دانشگاه واشنگتن در سنت لوئیس میسوری تهیه شده است.

کشت سلول: سلول‌های HEK-293T که نقش مولد ویروس را بازی می‌کنند در محیط DMEM حاوی ۱۰ FBS درصد، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت و پاساژ داده شدند. حدود دو و نیم میلیون سلول در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول، کشت داده شدند تا در روز بعد ۶۰ درصد پتری دیش را پر کنند. همچنین سلول‌های نورونی PC12 به‌عنوان سلول‌های هدف ویروس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت و پاساژ داده شدند. برای آلوده سازی ویروسی تعداد ۵۰ هزار سلول PC12 در پلیت ۲۴ خانه، ۲۴ ساعت قبل از آلوده سازی کشت داده شدند.

تولید ویروس: برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب، سلول‌های مولد ویروس یعنی HEK-293T هم‌زمان با سه ناقل لنتی ویروسی به مقدار ۲۰ میکروگرم از ناقل ترانسفر و ۱۵

مرحله‌ی Extension در ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه به انجام رسید. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵ درصد آنالیز و عکس برداری شد.

ایجاد سمیت پارکینسونی و سنجش بقا: سلول‌های آلوده شده و سلول‌های کنترل در معرض غلظت ۱۰۰ میکرومولار از توکسین 6-OHDA به‌عنوان LD50 قرار گرفتند و پس از ۴۸ ساعت میزان بقای آن‌ها با روش 2-[4,5-dimethylthiazol-3-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) اندازه‌گیری شد. استوک ۵ میلی‌مولار 6-OHDA (سیگما) حاوی ۰/۹ درصد سالیین (Phosphate buffered saline)، ۰/۱ درصد آسکوربات و ۱۰ میلی diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC) در نیتروژن حل شده و قبل از ذخیره سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد توسط فیلتراسیون، استریل شد. برای تعیین LD50 توکسین، سلول‌ها توسط رقت‌های سریالی از 6-OHDA برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و غلظتی از توکسین که در آن نیمی از سلول‌ها از بین می‌رفتند به‌عنوان LD50 انتخاب شد. همچنین برای سنجش MTT، با حل کردن استوک این ماده در سالیین، غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آن تهیه شد و پس از استریل کردن آن توسط فیلتراسیون، ۲۰ میکرولیتر از آن به ۱۸۰ میکرولیتر از محیط DMEM فاقد FBS در هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در شرایط انکوباتوری ذکر شده نگهداری شد. سپس این محیط با ۲۰۰ میکرولیتر از Dimethyl Sulfoxide (DMSO) جایگزین شد و پس از ۵ دقیقه انکوبه شدن، میزان جذب در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب *pLV-DJI*

سلول‌های ترانسفکت شده در فواصل زمانی متوالی در زیر میکروسکوپ فلورسنت مشاهده گردید. این مشاهدات آغاز بیان ژن Jred را در سلول‌های HEK-293T، ۹ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد. در ساعات بعدی بیان این ژن تشدید شد تا نهایتاً ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن این بیان به حدود ۷۰ درصد رسید (شکل ۱).

میکروگرم از هر یک از ناقلین بسته بندی و غشایی، با روش رسوب DNA- فسفات کلسیم ترانسفکت شد. این سه ناقل همراه با ۵۰ میکرولیتر از کلرید کلسیم ۲/۵ میلی مولار، با آب استریل به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسیدند و هم حجم آن HEPES اضافه شد. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در زیر هود و در دمای اتاق انکوبه شد تا رسوب مورد نظر به دست آید. سپس این رسوب قطره قطره به محیط سلول‌های HEK-293T اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. این سلول‌ها جهت تولید ویروس و رها سازی آن به محیط کشت، در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO₂ ۵ درصد نگهداری شدند.

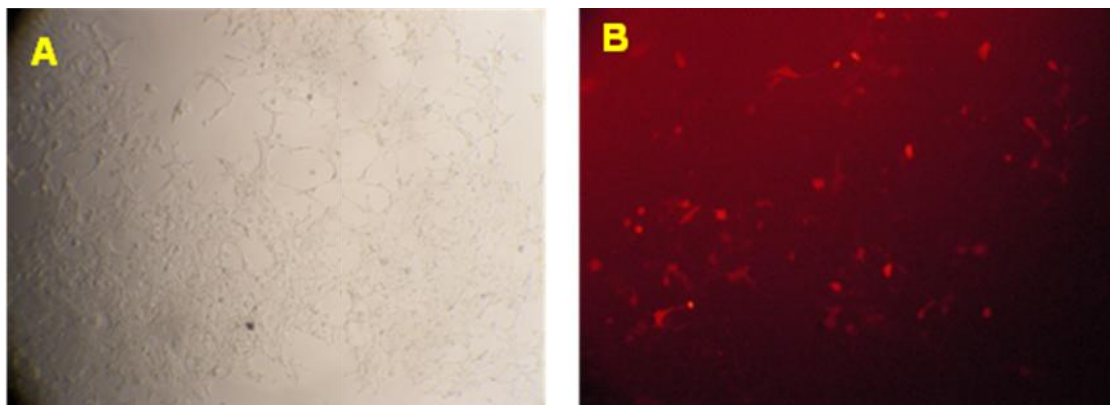
تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلول‌های هدف: محیط سلول‌های ترانسفکت شده، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس محیط فیلتر شده به درون ستون‌های آمیکون 100 MW منتقل و مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد. محلول حاصل باقی مانده پشت فیلتر که سرشار از ذرات ویرونی بود جمع آوری شد. حجم‌های مختلف از این محلول برای آلوده سازی سلول‌های هدف یعنی PC12 استفاده شد. سپس سلول‌های مزبور در شرایط انکوباتوری ذکر شده قرار داده شدند تا بیان ژن J-RED موجود در ناقل انتقالی، توسط میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و بررسی شود.

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR نود و شش ساعت پس از ترانسدوکشن، کل RNA سلولی توسط کیت حاوی RNX (سیناژن) استخراج شده و پس از اطمینان از سلامت کامل آن روی ژل، ۲ میکروگرم از آن برای سنتز cDNA به کار برده شد. ساخت cDNA به کمک آنزیم ترانسکریپتاز معکوس از (Fermentas, Lithuania) و در حضور هگزامرهای رندوم و مهارکننده RNase صورت گرفت. برای تکثیر یک قطعه ۲۶۰ جفت بازی از cDNA ی مربوط به DJ-1 انسانی، جفت پرایمر زیر بر اساس توالی کدکننده آن طراحی و سنتز شد (Genebank accession no. NG008271)

Forward: 5 -CGGGGTGCAGGCTTGTAAG-3

Reverse: 5 -ACCACATCACGGCTACTG-3

مقادیر یکسان از نمونه‌های cDNA برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲ دقیقه از دناتوراسیون نمونه‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واکنش PCR با سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، Annealing در ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و

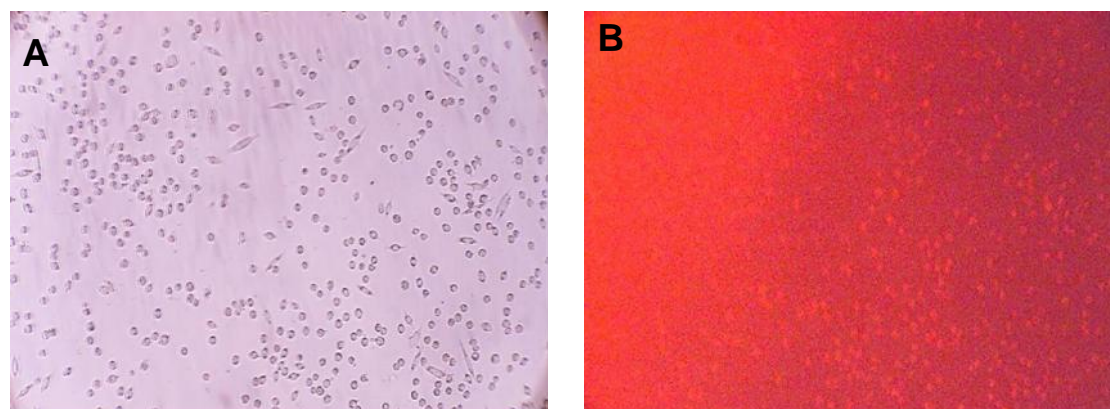


شکل ۱: بیان ژن Jred در سلول‌های HEK-293T. این تصاویر ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس تهیه شده است (A=سلول‌های طبیعی، B=سلول‌های پس از ترانسفکشن). بزرگ‌نمایی: 100x.

فلورسنت مشاهده شد. بیان Jred در فاصله زمانی ۹۶ ساعت به حداکثر خود رسید (شکل ۲).

ترانسداکشن سلول‌های PC12 و بیان ژن گزارشگر

حدود ۴۸ ساعت پس از افزودن استوک ویروسی به سلول‌های PC12 اولین نشانه‌های بیان Jred با استفاده از میکروسکوپ

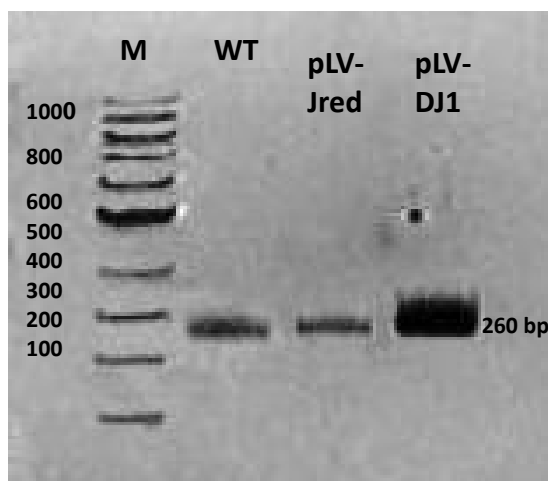


شکل ۲: بیان ژن Jred در سلول‌های PC12. این تصاویر ۹۶ ساعت پس از پس از آلوده سازی ویروسی (ترانسداکشن) سلول‌های PC12 که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس تهیه شده است (A=سلول‌های طبیعی B=سلول‌ها پس از ترانسداکشن). بزرگ‌نمایی: 50x.

و بعد از ترانسداکشن مشاهده شد (شکل ۳). این آزمایش‌ها نشان داد که میزان بیان DJ-1 در سلول‌های آلوده شده به ویروس PLV-DJ1 نسبت به سلول‌های طبیعی و سلول‌های آلوده شده با ویروس کنترل (pLV-Jred) افزایش یافته است (شکل ۳).

افزایش بیان ژن DJ-1

ده روز پس از آلوده سازی سلول‌های PC12 توسط ویروس‌های هدف و اطمینان از بیان ترانس ژن، RNA این سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از تکنیک RT-PCR میزان بیان ژن DJ-1 قبل

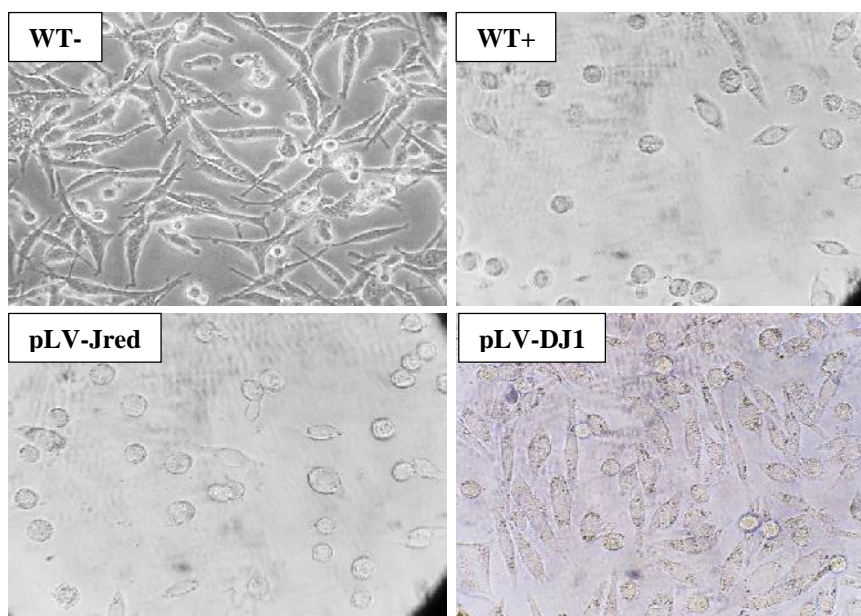


شکل ۳: افزایش بیان *DJ-1* در سلول‌های *PC12* این تصویر ژل الکتروفورز، از نمونه‌ی واکنش مزبور بر روی قطعه‌ی ۲۶۰ جفت بازی در ناحیه کدکننده ژن *DJ-1* تهیه شده است. اندازه باندها بر اساس جفت باز مشخص شده است. *M* (مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی *RNA*)، *WT* (*Wild-type*) سلول‌های طبیعی *PC12*، *pLV-Jred* (سلول *PC12* آلوده شده با ویروس کنترل حاوی ژن *Jred*)، *pLV-DJ1* (سلول *PC12* آلوده شده با ویروس حاوی ژن *DJ-1*).

سلولی اضافه شد تا میزان مقاومت آن‌ها در برابر سمیت پارکینسونی تعیین شود. شکل ۴ تصویری از سلول‌ها را ۲۴ ساعت پس از افزودن 6-OHDA نشان می‌دهد.

افزایش بقای سلول‌های *PC12* با افزایش بیان *DJ-1*

پس از اینکه سلول‌های *PC12* افزایش بیان *DJ-1* را به روشنی نشان دادند، توکسین 6-OHDA به گروه‌های مختلف

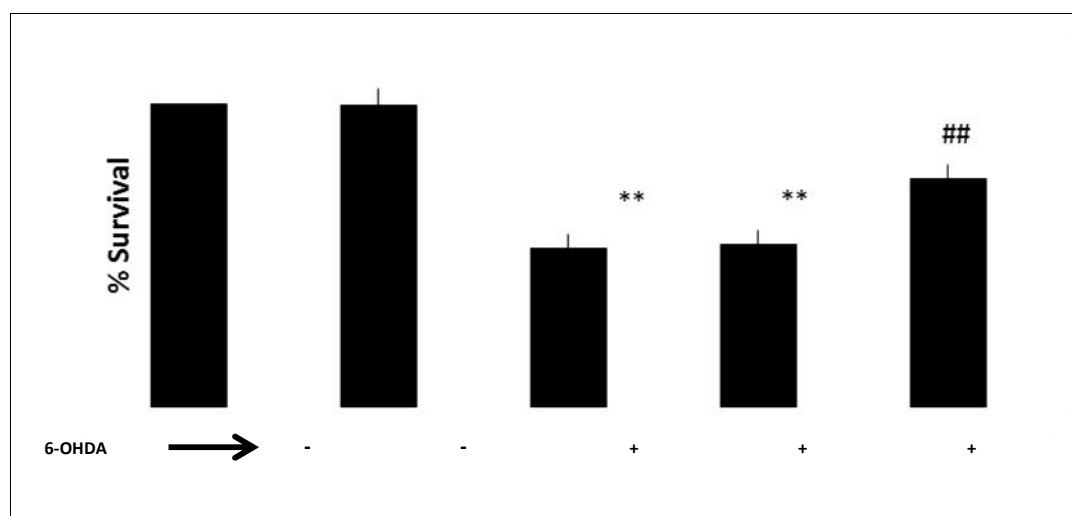


شکل ۴: بقای سلول‌های *PC12* در برابر سمیت پارکینسونی. این تصاویر میکروسکوپی ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با توکسین 6-OHDA تهیه شده است. سلول‌های گروه *WT-* تنها گروه تیمار نشده است. بزرگ‌نمایی = 200x

عین حال پس از تیمار با توکسین، بین سلول‌های طبیعی و سلول‌های گروه pLV-Jred اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این در حالی است که سلول‌های pLV-DJ1 پس از تیمار با 6-OHDA به میزان $3 \pm 78\%$ درصد زنده ماندند. این میزان بقا نسبت به میزان بقای سلول‌های کنترل (چه طبیعی و چه pLV-Jred) بسیار معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

افزایش کمی بقا نوروها در حضور DJ-1

داده‌های حاصل از سنجش MTT در شکل ۵ نشان داده شده است. سلول‌های طبیعی و سلول‌های گروه pLV-Jred پس از تیمار به ترتیب به میزان $2 \pm 51\%$ درصد و $4 \pm 52\%$ درصد زنده ماندند که این میزان نسبت به درصد بقای سلول‌های هم گروه قبل از تیمار با 6-OHDA بسیار معنی‌دار بود ($p < 0.01$).



شکل ۵: افزایش بقای سلول‌های PC12 پس از افزایش بیان DJ-1. این نمودار درصد بقای سلول‌های PC12 را پس از افزایش بیان ژن DJ-1 نشان می‌دهد که از سنجش MTT به دست آمده است. هر ستون نماینده ۳ آزمایش مستقل است که به صورت تریپلیکیت انجام شده است. اختلاف آماری داده‌ها بین گروه‌های تیمار شده pLV-DJ1 و گروه طبیعی (WT) با کنترل تیمار نشده آن‌ها با علامت * نشان داده شده است. این اختلاف بین گروه تیمار شده pLV-DJ1 و دو گروه تیمار شده WT و pLV-Jred با علامت ## نشان داده شده است.

توکسین پارکینسونی از خود بروز می‌دهند.

حفاظت سلول‌های دوپامین ساز در برابر سیگنال‌های مرگ یکی از استراتژی‌های مهم برای مقابله با PD و بیماری‌های وابسته به شمار می‌رود (۲۶). سیگنال‌های مرگ در اثر افزایش استرس اکسیداتیو و نیز از التهاب عصبی در مغز بیماران فوق منشأ می‌گیرد. در این زمینه گزارش‌ها حکایت از افزایش رادیکال‌های آزاد در جسم سیاه مغز پارکینسونی دارد و این تغییرات با اختلالات نوروبیولوژیکی مشاهده شده در مبتلایان به PD هم‌خوانی دارد (۲۷). به این دلیل، تلاش‌ها برای به حداقل رساندن می‌تواند ارزش درمانی زیادی داشته باشد.

چندین مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو وجود دارد که شامل آنتی‌اکسیدانت‌های غیر آنزیمی از جمله: آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، ویتامین E و غیره می‌باشد (۲۸-۳۰). همچنین مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانت آنزیمی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پروکسی

بحث

در این مطالعه، تاثیر افزایش بیان پروتئین DJ-1 بر حفظ سلول‌های دوپامین ساز PC12 در برابر سمیت ناشی از 6-OHDA مورد بررسی قرار گرفت. در بدو امر لنتی ویروس‌های نو ترکیب ساخته شد که ژن DJ-1 را با خود حمل می‌کردند (۲۵). سلول‌های PC12 با این ویروس‌ها آلوده شده و شروع به بیان ژن گزارشگر Jred کردند که توام با DJ-1 در سازه لنتی ویروسی گنجانده شده بود. متعاقباً افزایش بیان DJ-1 نیز در سلول‌های مزبور با تکنیک RT-PCR به اثبات رسید. سلول‌های مهندسی شده فوق در معرض توکسین پارکینسونی 6-OHDA قرار گرفت. بررسی میزان بقای سلولی نشان داد که سلول‌های فوق در مقایسه با سلول‌های کنترل مقاومت معنی‌دار بیشتری نسبت به سمیت 6-OHDA نشان می‌دهند. متعاقباً آنالیز MTT نشان داد که سلول‌های PC12 با بیان فزاینده DJ-1 مقاومت بیشتر و معنی‌داری نسبت به سلول‌های کنترل در برابر

سلول‌های PC12 منتقل شده است در بدو امر به‌طور موفقیت آمیز منجر به افزایش بیان ژن DJ-1 شده است. در گام بعدی این تغییر در میزان بیان DJ-1 توانسته است مقاومت سلول‌ها در برابر سمیت ناشی از 6-OHDA را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. این نتایج نشانگر آن است که مقدار پروتئین DJ-1 که در سلول‌های مهندسی شده PC12 بیان شده است برای مقابله با افزایش رادیکال‌های آزاد و یا خنثی سازی اثر مخرب آن‌ها تاثیرگذار بوده و این تاثیر DJ-1 از نظر آماری محسوس بوده است. بدین ترتیب، ما در طی مطالعه حاضر لنتی ویروس DJ-1 را تولید کرده و با موفقیت آزمودیم که می‌تواند ابزار مفیدی در مطالعات حفاظت نورونی در برابر استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی به‌شمار آید.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه نتایج این مطالعه را می‌توان در موارد زیر خلاصه کرد:
 ۱- افزایش بیان DJ-1 در سلول‌های PC12 با انتقال ژن آن توسط لنتی ویروس‌های نو ترکیب امکانپذیر است.
 ۲- افزایش بیان DJ-1 در سلول‌های PC12 می‌تواند با استرس اکسیداتیو ناشی از 6-OHDA مقابله کرده و سلول‌ها را حفظ نماید.

تشکر و قدردانی

از کمک آقای عمران اسماعیل زاده در تهیه کلون‌ها و همکاری تکنیکی سپاسگزاری می‌شود.

ردوکسین را می‌توان نام برد که جزو دفاع ضد اکسیداتیو سلول به‌شمار می‌رود. علاوه بر این، مکانیسم سوم دفاع آنتی اکسیداتیو شامل تعمیر پروتئین‌های آسیب دیده و یا تجزیه آن‌ها وجود دارد که تیو رودوکسین‌ها و سیستم پروتئازومی در آن دخیل می‌باشند (۳۱).

اینک با مسجل شدن نقش استرس اکسیداتیو در آسیب رساندن به مولکول‌های حیاتی استراتژی‌های حفاظت نورونی در این راستا تدوین و تنظیم می‌شوند که از طریق مقابله با استرس اکسیداتیو از مرگ سلول‌ها و شکل‌گیری یا پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو جلوگیری نماید. شکل‌گیری چنین شیوه‌هایی حداقل در مورد PD در بدو امر مستلزم آن است که منابع باز تولید و یا افزایش استرس اکسیداتیو در مغز میانی شناسایی شوند تا سپس مکانیسم آسیب‌های وارده از آن به سلول‌های دوپامین ساز بررسی شود. با داشتن این اطلاعات می‌توان به‌دنبال یافتن راه‌ها و ابزاری رفت که این مکانیسم‌ها را مختل کرده و با آسیب اکسیداتیو به سلول‌های مزبور مقابله نماید.

در این مطالعه مکانیسم ایجادکننده و تشدیدکننده رادیکال‌های آزاد و سیگنال‌های مرگ آفرین مغز میانی مد نظر قرار گرفت: استرس اکسیداتیو در اثر سمیت پارکینسونی که 6-OHDA آن‌را شبیه سازی می‌کند. فرضیه کانونی این مطالعه بر این اساس استوار شد که پروتئین DJ-1 به‌علت دارا بودن ویژگی‌های منحصر به‌فرد خود از نظر ضدآپوپتوزیس و ضد التهاب عصبی می‌تواند سلول‌ها را در برابر توکسین محافظت نماید.

نتایج این مطالعه بر آن است که سازه لنتی ویروسی که به

منابع

- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993; 262(5134): 689-95.
- Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005; 37(5): 942-6.
- Gardaneh M. Dopamine-synthesizing neurons: An overview of their development and application for cell therapy. *Iran J Biotechnol*. 2010; 8(4): 8.
- Smith Y, Kieval JZ. Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*. 2000; 23: S28-S33.
- Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation withras. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997; 231(2): 509-13.
- Hedrich K, Djarmati A, Schäfer N, Hering R, et al. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *neurology*. 2004; 62(3): 389-94.
- Annesi G, Savettieri G, Pugliese P, D'Amelio M, et al. DJ 1 mutations and parkinsonism dementia amyotrophic lateral sclerosis complex. *Annals of neurology*. 2005; 58(5): 803-7.
- Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, et al. Earlyonset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Annals of neurology*. 2003; 54(2): 271-4.
- Abou Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Annals of neurology*. 2003; 54(3): 283-6.
- Takahashi K, Taira T, Niki T, Seino C, et al. DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx to the receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(40): 37556-63.
- Niki T, Takahashi-Niki K, Taira T, Iguchi-Aruga SM, et al. DJBP: A Novel DJ-1-Binding Protein, Negatively Regulates the Androgen Receptor by Recruiting Histone Deacetylase

- Complex, and DJ-1 Antagonizes This Inhibition by Abrogation of This Complex1 1 Ministry of Education, Science, Sport, Culture and Technology of Japan. 2 2 The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the DDBJ/GenBank/EBI Data Bank with accession number AB073862. *Molecular Cancer Research*. 2003;1(4): 247-61.
12. Sekito A, Taira T, Niki T, Iguchi-Arigo SM, et al. Stimulation of transforming activity of DJ-1 by Abstrakt, a DJ-1-binding protein. *International journal of oncology*. 2005; 26(3): 685-9.
13. Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, et al. Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 317(3): 722-8.
14. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi Ariga SM, et al. DJ 1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports*. 2004; 5(2): 213-8.
15. Canet-Avilés RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101(24): 9103-8.
16. Honbou K, Suzuki NN, Horiuchi M, Niki T, et al. The crystal structure of DJ-1, a protein related to male fertility and Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(33): 31380-4.
17. Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Arigo SM, et al. Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004; 320(2): 389-97.
18. Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, et al. Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(9): 8506-15.
19. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, et al. DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits α -synuclein aggregate formation. *PLoS biology*. 2004; 2(11): e362.
20. Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA, et al. The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward α -synuclein. *Journal of molecular biology*. 2006; 356(4): 1036-48.
21. Chen L, Cagniard B, Mathews T, Jones S, et al. Age-dependent motor deficits and dopaminergic dysfunction in DJ-1 null mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(22): 21418-26.
22. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(14): 5215-20.
23. Goldberg MS, Pisani A, Haburcak M, Vortherms TA, et al. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. *Neuron*. 2005; 45(4): 489-96.
24. Inden M, Taira T, Kitamura Y, Yanagida T, et al. PARK7 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease rat model. *Neurobiology of disease*. 2006; 24(1): 144-58.
25. Naldini L, Dull T, Farson DA, Witt R. Method and means for producing high titer, safe, recombinant lentivirus vectors. US PATENT 6165782 A, 2000.
26. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura J-I, Matsuoka Y, et al. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Molecular pharmacology*. 1998; 54(6): 1046-54.
27. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Movement Disorders*. 1994; 9(1): 92-7.
28. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *The American journal of clinical nutrition*. 1991; 54(6 Suppl): 1113S-8S.
29. Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E, Rivera E, S, et al. Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain research*. 2005; 1061(2): 114-7.
30. Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. 1996; 29(6): 511-5.
31. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Molecular aspects of medicine*. 2009; 30(4): 191-296.

Increasing of dopaminergic PC12 cell survival against 6-OHDA-mediated toxicity following over expression of DJ-1 factor

Lasemi S, M.Sc. Student¹, Gardaneh M, Ph.D.^{2*}, Parvin Akbari P, M.Sc. Student¹

1. M.Sc. Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

2. Dept of Stem cells and Regenerative Medicine Group, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

* Email corresponding author: mossa65@yahoo.com , Mossa65@nigeb.ac.ir

Received: 18 Jun. 2015

Accepted: 15 Aug. 2015

Abstract

Aim: The purpose of this study is to examine DJ-1 effect on increasing survival of dopaminergic (DAergic) cells against parkinsonian toxicity.

Material and Methods: First recombinant lenti-viruses transporters were produced with both DJ-1 and reporter Jred genes and were used to cells infection. To this end, three lentiviruses vectors namely transporter, packaging and envelope were applied for co-transfection of HEK-293T cells as virus-producing cell line. 24 and 48 hours transfected cell media were collected and concentrated till lentivirus stock generation. Following transduction of DAergic PC12 cells with this concentrated virus stock, the infected cells overexpressed DJ-1. After treatment of these transduced cells with the 6-OHDA toxin, their survival rate was measured in comparison with control.

Results: Transfection HEK-293T cells steps and PC12 cells transduction with the virus stock were done successful, because reporter Jred gene expression was observed using fluorescence microscope in both steps. Then DJ-1 overexpression was proofed using RT-PCR method. Next experiments indicated that DJ-1 overexpression causes significant increase in PC12 cells survival against produced toxicity of 6-OHDA. PC12 cell survival percentage that had DJ-1-overexpressing was 30% more than control cells survival percentage and this increasing was statistically significant.

Conclusion: increasing of DJ-1 expression in DAergic PC12 cells significantly increased their resistance and perpetuity against 6-OHDA neurotoxicity.

Keywords: Parkinson, DJ-1, dopaminergic, neuroprotection