

چگونگی تکوین سلول‌های شبکه‌ای از طریق انتقال ژن PAX6 به سلول‌های CD133⁺ به دست آمده از بند ناف انسان

سحر بالاقلی^۱، صدیقه امینی کافی‌آباد^۲، زهرا سهیلا سهیلی^۳، شهرام سمیعی^۴، حمید احمدیه^۵،
مژگان رضایی کنوی^۶، مهین نیکوگفتار ظریف^۷، ناریس دفتریان^۸

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی CD133⁺ بند ناف، زیر گروهی از سلول‌های خونساز را تشکیل می‌دهند. ثابت شده که این سلول‌ها از توانایی تمایز خوبی به سمت سلول‌های عصبی برخوردار هستند. ژن PAX6 جزئی از خانواده چند ژنی PAX و از فاکتورهای رونویسی است. ژن PAX6 ژن کنترل‌کننده اصلی تکامل چشم و اندام‌های حسی بافت‌های اپیدرمی و عصبی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی روند تمایزی سلول‌های CD133⁺ به دست آمده از بند ناف که ژن PAX6(5a) به آن‌ها انتقال یافته است بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف به وسیله فایکول جدا شدند، سپس سلول‌های CD133⁺ موجود در آن با روش MACS جدا و در محیط کشت Stem Span کشت داده شدند. سپس به منظور ساخت ویروس، وکتور ناقل ژن PAX6 و وکتورهای کمکی (pMD2G، psPAX2) به سلول‌های HEK293T ترانسفکت شدند. پس از تغلیظ ویروس و تیتراژ کردن آن، سلول‌های CD133⁺ با تیتراژ مطلوب ویروس آلوده شدند. سلول‌های حاوی ویروس مورد نظر، از نظر وجود پروتئین‌های PAX6، Rhodopsin، Chx10، Thy1 و Nestin توسط روش ایمونوسایتوشیمی ارزیابی شدند.

یافته‌ها

پس از دو هفته پروتئین‌های Thy-1، Chx10، Nestin و PAX6 در سلول‌های آلوده شده بیان شدند. هم چنین بیان مارکرهای Rhodopsin و Nestin در سلول‌های کنترل مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر تمایز سلول‌های CD133⁺ به سلول‌های پروژنیتری عصبی و سلول‌های شبه عصبی شبکه‌ای از جمله سلول‌های گانگلیونی می‌باشد.

کلمات کلیدی: پروتئین PAX6، آنتی‌ژن CD133، خون بند ناف

تاریخ دریافت: ۹۳/ ۲/ ۶

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای آموزشی انتقال خون تهران - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: متخصص آسیب‌شناسی بالینی و تشریحی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- PhD بیوشیمی - استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی - تهران - ایران

۴- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۵- فوق تخصص شبکه‌ای - استاد مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۶- فوق تخصص شبکه‌ای - دانشیار مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۷- PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

امروزه با وجود پیشرفت‌های حاصل شده در علم چشم پزشکی، هنوز بیماری‌های ناشی از تخریب سلول‌های شبکیه به جهت ایجاد نابینایی برگشت ناپذیر، بزرگترین دغدغه چشم پزشکان محسوب می‌شود. از میان این بیماری‌ها، تخریب ماکولا وابسته به سن (Age = AMD related macular degeneration) که شایع‌ترین عامل نابینایی در بیماران بالای ۶۰ سال است و هم چنین رتینیت پیگمنتوزا (Retinit pigmentosa = RP) که شایع‌ترین بیماری دژنراتیو وراثتی در شبکیه است، را می‌توان نام برد. لازم به ذکر است که در هر دو مورد سلول‌های Retinal Pigment Epithelium (RPE)، فتورسپتورهای مخروطی (Cone photoreceptor) و فتورسپتور استوانه‌ای (Rod photoreceptor) تخریب می‌شوند (۱). متأسفانه درمان‌های کنونی تنها توانسته‌اند سیر پیشرفت بیماری را کند کنند، بدیهی است که این گونه درمان‌ها برای مراحل پیشرفته بیماری کارایی ندارد. به همین دلیل امروزه توجه محققان به درمان‌های ترمیمی و جایگزینی سلول‌های شبکیه معطوف شده است، در میان این درمان‌ها، روش‌های استفاده از سلول‌های بنیادی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۲، ۳).

از زمانی که کارایی استفاده از خون بند ناف در درمان بیماری‌های خونی اثبات شد، فکر ایجاد بانک خون‌های بند ناف شکل گرفت. با ایجاد تشکیلات و برقراری استانداردهای جهانی، محققان به گام‌های بلندتری می‌اندیشند که یکی از آن‌ها دسترسی به سلول‌های سایر بافت‌ها از طریق تمایز سلول‌های موجود در بند ناف است. امروزه ثابت شده سلول‌های موجود در بند ناف به جهت اولیه‌تر بودن نسبت به سلول‌های بنیادی به دست آمده از بالغین، پتانسیل دگر تمایزی خوبی دارند (۴-۶). در این مطالعه سلول‌های بنیادی $CD133^+$ موجود در خون بند ناف انسان، به عنوان منبعی جهت دستیابی به انواع سلول‌های شبکیه مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به آن که تمایز سلول بنیادی به تعادل حساسی بین فاکتورهای داخلی و خارجی نیاز دارد، در این مطالعه با القای بیان ژن *PAX6* در سلول‌های بنیادی خونساز

$CD133^+$ به دست آمده از بندناف علاوه بر اثر محیط، تاثیر این ژن نیز به عنوان یک فاکتور داخلی اثرگذار بررسی شد. ژن *PAX6* جزیی از خانواده چند ژنی *PAX* و از فاکتورهای رونویسی است. پروتئین‌های حاصل از این خانواده در تکامل اولیه جانوران و برای اختصاصی شدن بعضی بافت‌های خاص ضروری هستند. از میان ژن‌های این خانواده ژن *PAX6* به عنوان ژن کنترل‌کننده برای تکامل چشم و اندام‌های حسی بافت‌های اپیدرمی و عصبی خاص که همگی منشاء اکتودرمی دارند، محسوب می‌شود (۸، ۷).

ژن *PAX6* ژن کنترل‌کننده در تکوین چشم بوده و در تشکیل عدسی، عنبیه، شبکیه و قرنیه نقش اساسی دارد (۱۰، ۹). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد *PAX6* در بافت‌های آسیب‌دیده چشم بیان می‌شود تا به ترمیم این بافت‌ها کمک کند. هم چنین دیده شده تنظیم مصنوعی بیان *PAX6* می‌تواند منجر به القای بازسازی بافت آسیب دیده چشم شود (۸، ۷). ژن *PAX6* دارای دو ایزوفرم می‌باشد که در این مطالعه از ایزوفرم *PAX6(5a)* استفاده شده است. این ایزوفرم دارای ۱۴ آمینو اسید اضافی نسبت به ایزوفرم دیگر این ژن *PAX6(5b)* می‌باشد که توسط اگزون 5a کد می‌شود و به نظر می‌رسد نقش مؤثرتری در تکوین سلول‌های چشم بازی می‌کند (۱۱).

هدف این طرح بررسی اثر ژن *PAX6(5a)* بر سلول‌های خون ساز $CD133^+$ به دست آمده از خون بند ناف انسان بود. سلول‌های $CD133^+$ به علت پتانسیل بالایی که در تمایز به سلول‌های بافت‌های مختلف از جمله سلول‌های عصبی داشته‌اند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

هم چنین در مطالعه‌ها دیده شده که سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از مغز استخوان به تعمیر RPE کمک می‌کنند و در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر روی خون بند ناف انجام شد، مشاهده گردید که سلول‌های رده منفی (Negative Lineage) موجود در بند ناف در *in vivo* به سلول‌های عصبی شبکیه متمایز می‌شوند (۱۲). ژن *PAX6(5a)* به واسطه وکتور (لنتی ویروس) به این سلول‌ها منتقل شده سپس مسیرهای تمایزی سلول مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های $CD133^+$ از خون بند ناف:

در یک مطالعه تجربی برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، نمونه خـون بند ناف که حجمی حدود ۱۵۰ میلی لیتر دارد با نسبت یک به یک با بافر هنکس رقیق و با نسبتی حدود یک به دو تا یک به سه (فایکول: خون بند ناف) روی فایکول برده شد. برای این کار از محلول فایکول با دانسیته ۰۷۷/۱ استفاده شد.

بدین ترتیب که از محلول فایکول مقدار ۳ تا ۴ میلی لیتر در یک لوله فالكون ۱۵ میلی لیتری ریخته، سپس سوسپانسیون سلولی را آرام به آن اضافه نموده و به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۴۰۰ سانتریفوژ می‌شود. بعد از این که زمان سانتریفوژ پایان یافت، محتویات لوله فالكون به ۴ قسمت مجزا از هم تقسیم می‌شود که از پایین به بالا عبارتند از: ۱- گلبول‌های قرمز ۲- فایکول ۳- لایه سلول‌های تک هسته‌ای ۴- پلاسما با برداشت لایه سلول‌های تک هسته‌ای. سلول‌ها به حالت سوسپانسیون آورده شده و از نمونه خون بند ناف جدا شدند. در مرحله بعد ۲۰۰ لاندای محلول بلوکه کننده به سلول‌ها اضافه شد، ۵ دقیقه بعد ۲۰۰ لاندای $CD133^+$ microbead Ab به لوله اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سوسپانسیون سلولی به ستون (MACS = Magnetic activated cell sorting) منتقل شد. در مرحله بعد ستون از دستگاه جدا شده و محتویات آن به یک لوله فالكون منتقل شد سپس لوله فالكون سانتریفوژ شد و سلول‌های حاصل در محیط مخصوص Stem Span و حاوی SCF ۵۰ ng + $FLT3$ ۵۰ ng + TPO ۴۰ ng کشت داده شدند. در نهایت جهت ارزیابی درجه خلوص سلول‌های $CD133^+$ جدا شده، فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی‌های آنتی $CD34$ و آنتی $CD133$ انجام شد.

انتقال سازه نو ترکیب لنتی $PAX6^-$ و پلاسמיד‌های کد کننده پروتئین‌های پوششی و ساختاری ویروس به سلول‌های $T 293$:

تقریباً حدود ۲۴ ساعت پیش از آلوده‌سازی (Transfection)، سلول‌های $T 293$ کشت شبانه داده شدند تا به تراکم

سطحی ۷۰٪ برسند. آلوده‌سازی هم‌زمان پلاسמיד نو ترکیب لنتی $PAX6^-$ ، پلاسמיד $PMD2$ (کد کننده پروتئین‌های پوششی) و پلاسמיד $PAX2$ (کد کننده پروتئین‌های ساختاری gag و pol) توسط روش کلسیم فسفات انجام شد. محیط کشت پس از ۱۲ ساعت تعویض شد.

تخلیظ ذرات ویروسی و تعیین تیترو ویروسی:

پس از ۷۲ ساعت از جمع‌آوری محیط کشت، محیط رویی سلول‌ها که حاوی ویروس‌های تولید شده است، جمع‌آوری و سوسپانسیون ویروسی حاصل از دوره‌های مختلف کار با هم مخلوط شد. در مرحله بعد $Peg 6000$ (Polyethylene glycol) با غلظت نهایی ۸٪ به محلول اضافه شد. سپس محلول را به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از این مدت محلول برای ۱۵ دقیقه در $7000g$ سانتریفوژ شد. در نهایت به میزان ۰/۰۱ حجم اولیه $1 \times PBS$ اضافه و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. به منظور تعیین تیترو ویروس‌های تولید و تخلیظ شده، سلول‌های $T 293$ با رقت‌های مختلف ویروس (از ۱/۲ تا ۱/۴۰۹۶) آلوده و پس از ۴۸ ساعت میزان بیان پروتئین گزارشگر GFP (green fluorescent protein) توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

آلوده‌سازی سلول‌های $CD133^+$ جهت بررسی‌های مورفولوژیکی:

میزان ۴۰۰ میکرولیتر از تیترو مورد نظر ویروس در ۱ ویال حاوی محیط کشت SCF ۵۰ ng + $Stem Span$ + $Flt3$ ۵۰ ng + TPO ۴۰ ng تهیه و تعداد ۵۰۰۰۰۰ سلول به آن اضافه شد، پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO_2 ، محتویات ویال‌ها به پلیت ۶ خانه‌ای منتقل شده و ۱۶۰۰ میکرولیتر محیط $Stem Span$ به چاهک‌ها اضافه شد. ۱- میزان ۲۰۰ میکرولیتر از تیترو مورد نظر در ویال ۵/۰ و در محیط کشت SCF ۵۰ ng + $Stem Span$ + $Flt3$ ۵۰ ng + TPO ۴۰ ng تهیه و تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول به آن اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO_2 ، محتویات ویال‌ها به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای منتقل شده و ۸۰۰ میکرولیتر محیط $Stem Span$ به چاهک‌ها

اضافه شد.

mounting media و (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (رنگ زمینه) اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه چاهک‌ها با میکروسکوپ فلورسانس از نظر بیان مورد بررسی قرار داده شدند.

یافته‌ها

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی رده سلولی $CD133^+$ توسط مشاهدات میکروسکوپی با میکروسکوپ معکوس: پس از جداسازی و کشت سلول‌های $CD133^+$ در محیط کشت اختصاصی Stem Span، این سلول‌ها از نظر مورفولوژی بررسی شدند. مشخص شد که تعدادی از سلول‌های $CD133^+$ در محیط کشت به صورت سلول‌های گرد غیر چسبنده و تعدادی دارای زوائد کوچک و نیمه چسبنده هستند که به مرور زمان تعداد این سلول‌های نیمه چسبنده زائده‌دار افزایش می‌یابد (شکل ۱).

تایید حضور مارکرهای سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی $CD133^+$ با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی و دستگاه فلوسایتومتری:

پس از مشاهدات میکروسکوپی، این سلول‌ها از نظر بیان مارکر $CD133^+$ و $CD34^+$ مورد بررسی قرار گرفت. حضور ۹۰٪ مارکر $CD133$ و ۹۵٪ مارکر $CD34$ تاییدکننده سلول‌های $CD133^+$ می‌باشد.

تعیین تیتراژ ویروس حاوی GFP با استفاده از سلول HEK293T:

بعد از مجاورت سلول‌های $CD133^+$ با رقت‌های مختلف ویروس طبق آن چه که توضیح داده شد، این سلول‌ها ۳ روز بعد از ترانسداکشن از نظر بیان GFP در رقت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشاهده شد که در رقت ۱/۲، سلول‌ها تحت تاثیر غلظت بالای ویروس آسیب دیده بودند. در رقت ۱/۴ نیز سلول‌ها تا حدودی آسیب دیده بودند. رقت ۱/۸ بهترین کارایی ویروس و کمترین آسیب را به همراه داشت گرچه در رقت‌های بالاتر ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ بیان GFP وجود داشت ولی بالاترین کارایی در رقت ۱/۸ مشاهده شد (شکل ۲).

تیمار سلول‌های ترانسداکت شده با آنتی‌بیوتیک پرومیسین: برای حذف سلول‌های ترانسداکت نشده، بعد از گذشت ۳ روز از ترانسداکشن یک بار محیط سلول‌ها تعویض شد (روز سوم). روز بعد (روز چهارم) سلول‌های ترانسداکت شده به مدت ۶ روز در مجاورت آنتی‌بیوتیک پرومیسین با غلظت $0.4 \mu\text{g/mL}$ قرار گرفتند.

آزمایش ایمنوسیتوشیمی:

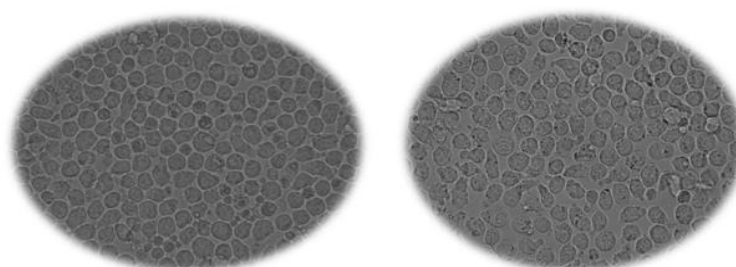
این آزمایش در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای انجام شد به این ترتیب که:

تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک ریخته شد. روز بعد محیط رویی چاهک‌ها تخلیه شده و هر چاهک با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد.

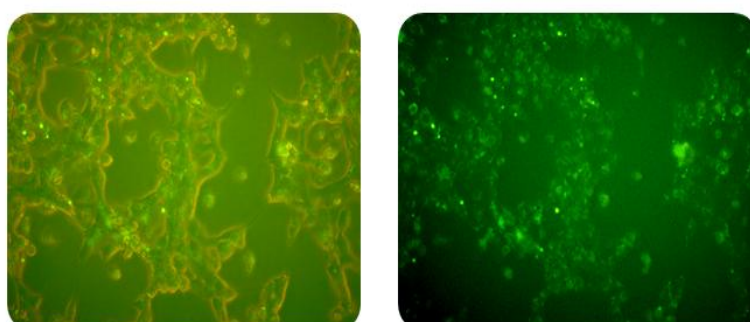
سلول‌های موجود در هر چاهک با متانول به مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول (۱٪) PBS – blocking TritonX100/BSA به هر چاهک اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از تخلیه محلول blocking آنتی‌بادی اولیه (بر علیه مارکرهای اختصاصی سلولی از قبیل: Rabbit AntiThy1 IgG، Rabbit AntiCHX10 IgG، AntiRhodopsin IgG، Rabbit AntiNestin IgG، Anti Pax6 IgG) به هر چاهک به جز چاهک کنترل اضافه شد و پلیت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

روز بعد آنتی‌بادی اولیه تخلیه و هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه با PBS شستشو داده شد. آنتی‌بادی ثانویه (بر علیه Fc آنتی‌بادی اولیه از قبیل: Gout Anti Donkey Anti gout Antibody، Rabbit antibody که کوئزوگه به FITC (Fluorescein Isothiocyanat) می‌باشد، به همه چاهک‌ها از جمله چاهک کنترل اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

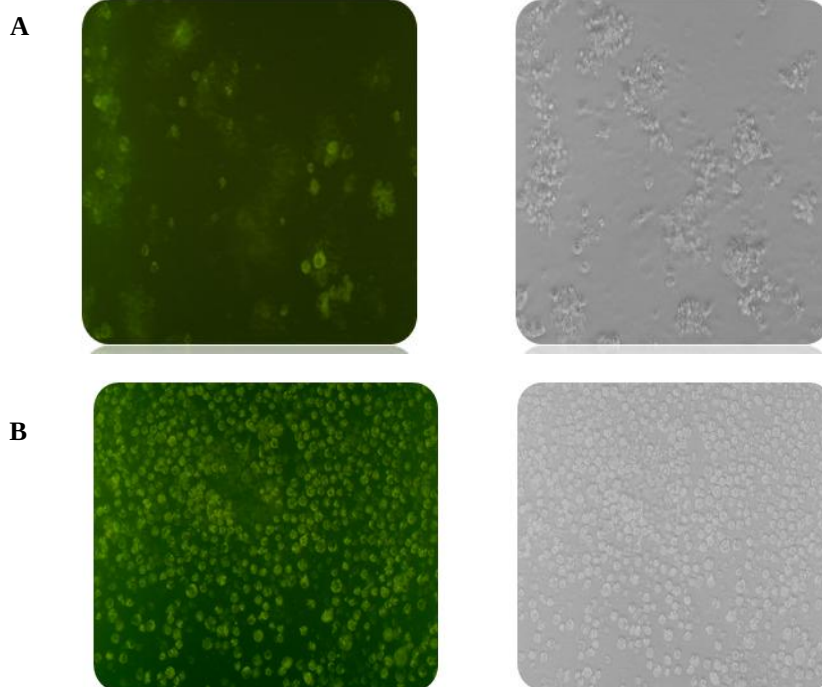
نکته آن که برای جلوگیری از خنثی شدن FITC در مقابل نور، پلیت در فویل پیچیده شد. بعد از این زمان آنتی‌بادی ثانویه تخلیه و هر چاهک سه بار و هر بار به مدت ۱ دقیقه با PBS شستشو داده شد. در این زمان DAPI



شکل ۱: سلول‌های $CD133^+$ جدا شده از بند ناف ۲ روز بعد از جداسازی نشان‌دهنده جمعیتی از سلول‌های غیر چسبنده و نیمه چسبنده می‌باشد. (بزرگ‌نمایی $400\times$)



شکل ۲: سلول‌های HEK293T ۳ روز بعد از مجاور شدن با رقت $1/8$ ویروس نشان‌دهنده بالاترین میزان بیان GFP و کمترین آسیب سلولی می‌باشد (بزرگ‌نمایی $200\times$)



شکل ۳: تصویر A: سلول‌های $CD133^+$ ۳ روز بعد از مجاورت با رقت $1/4$ لنتی ویروس حاوی GFP نشان‌دهنده بیان GFP و آسیب در اثر دوز بالای ویروس می‌باشد تصویر B: سلول‌های $CD133^+$ ۳ روز بعد از مجاورت با رقت $1/8$ لنتی ویروس حاوی GFP نشان‌دهنده بالاترین میزان بیان GFP و کمترین آسیب سلولی می‌باشد (بزرگ‌نمایی $200\times$)

تعیین تیتراژ ویروس حاوی GFP با استفاده از سلول HEK293T:

بعد از مجاورت سلول‌های CD133⁺ با رقت‌های مختلف ویروس طبق آن چه که توضیح داده شد، این سلول‌ها ۳ روز بعد از ترانسداکشن از نظر بیان GFP در رقت‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشاهده شد که در رقت ۱/۲، سلول‌ها تحت تاثیر غلظت بالای ویروس آسیب دیده بودند. در رقت ۱/۴ نیز سلول‌ها تا حدودی آسیب دیده بودند. رقت ۱/۸ بهترین کارایی ویروس و کمترین آسیب را به همراه داشت گرچه در رقت‌های بالاتر از ۱/۱۶ تا ۱/۶۴ بیان GFP وجود داشت ولی بالاترین کارایی در رقت ۱/۸ مشاهده شد (شکل ۲).

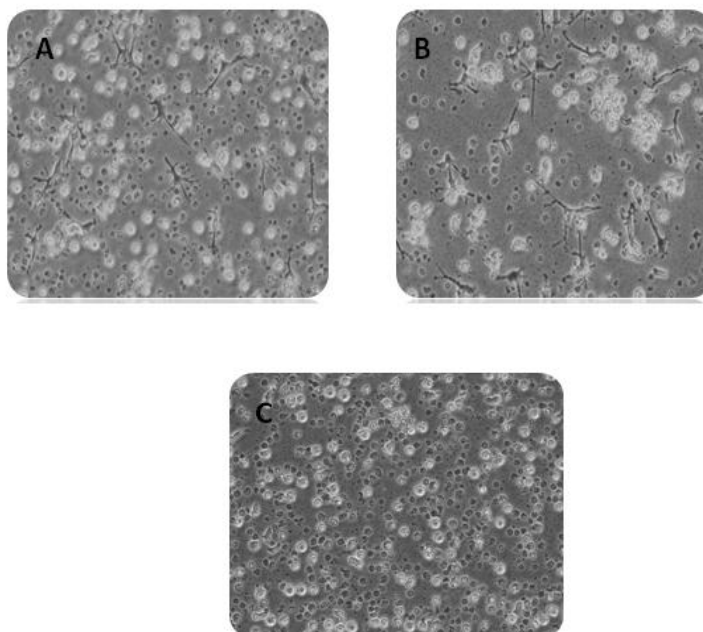
تایید تیتراژ ویروس GFP دار با استفاده از سلول‌های هدف:

بعد از به دست آوردن تیتراژ مطلوب ویروس GFP دار با استفاده از سلول‌های HEK293T برای اثبات کارایی این رقت بر سلول‌های هدف، این سلول‌ها با رقت مطلوب ویروس GFP دار (۱/۸) و دو رقت بالا و پایین‌تر از آن (۱/۴، ۱/۱۶) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده

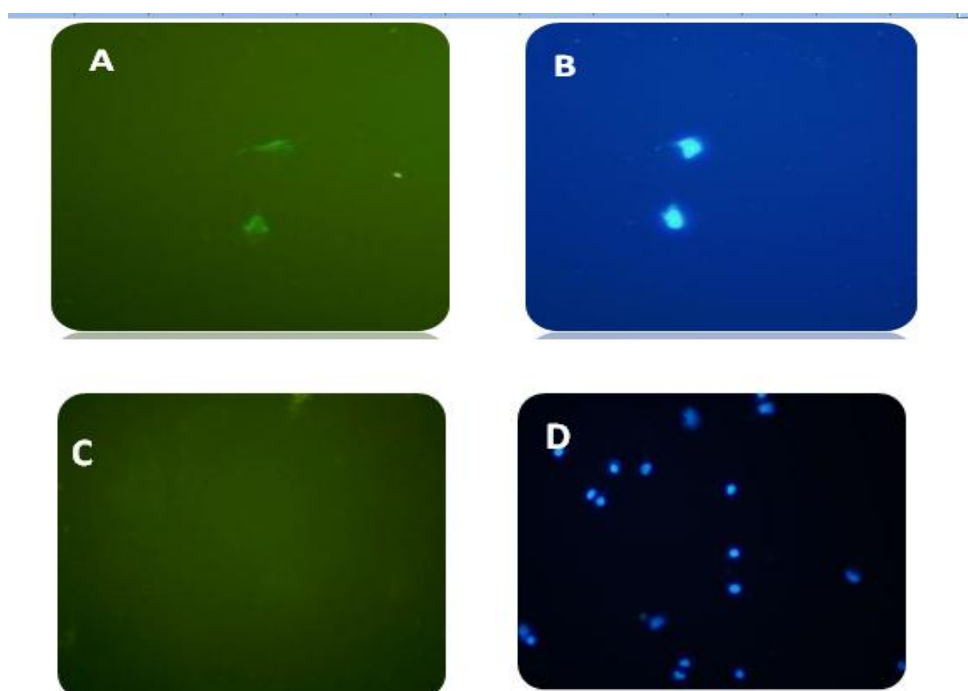
کارایی مطلوب در رقت ۱/۸ بود. ضمن آن که در رقت‌های ۱/۱۶ و ۱/۴ نیز بیان GFP مشاهده می‌شد ولی در رقت ۱/۴ سلول‌ها تا حد زیادی تحت تاثیر ویروس آسیب‌دیده بودند و GFP در رقت ۱/۱۶ بسیار ضعیف بیان شده بود (شکل ۳).

بررسی تغییرات مورفولوژیکی بعد از ترانسداکشن سلول‌های CD133⁺ با رقت ۱/۸ ویروس حاوی ژن PAX6:

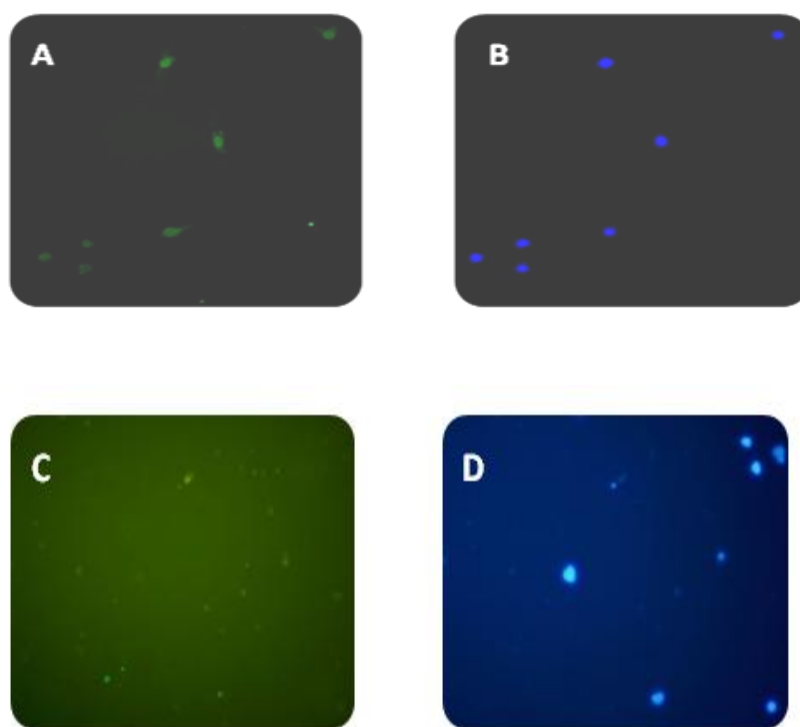
سلول‌های CD133⁺ در مجاورت تیتراژ مورد نظر ویروس حاوی ژن PAX6 قرار داده شد. بعد از آن هر ۲۴ ساعت تغییرات بررسی و ثبت گردید. نتایج نشان‌دهنده ایجاد تغییرات مورفولوژیکی از ۴۸ ساعت بعد از آلوده‌سازی بود. ۲ روز پس از آلوده‌سازی، سلول‌های CD133⁺ زوائد مویی شکلی که از یک قطب سلول کشیده می‌شد در آوردند. روز سوم سلول‌های تعویض محیط شده و از روز چهارم این سلول‌ها در مجاورت پرومایسین قرار داده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، پس از سه روز مجاورت با پرومایسین سلول‌های آلوده شده قابل افتراق از سلول‌های آلوده نشده (در حال مرگ) هستند (شکل ۴).



شکل ۴: سلول‌های CD133⁺ ۱۴ روز پس از آلوده‌سازی با ویروس حاوی ژن PAX6 و ۷ روز پس از مجاورت با آنتی‌بیوتیک پرومایسین (A,B) کنترل ۷ روز پس از مجاورت با آنتی‌بیوتیک پرومایسین (C)



شکل ۵: سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* پروتئین *Chx10* را به صورت هسته‌ای (irregular) بیان می‌کنند (A:FITC)، (B:DAPI)، (C,D) کنترل (بزرگ‌نمایی $200\times$)



شکل ۶: سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* پروتئین *PAX6* را به صورت هسته‌ای بیان می‌کنند (A:FITC)، (B:DAPI)، (C,D) کنترل (بزرگ‌نمایی $200\times$)

ارزیابی بیان پروتئین‌های *Nestin*، *Thy-1*، *Chx10*، *PAX6*، *Rhodopsin* در سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6* با استفاده از آزمایش ایمنوسیتوشیمی (ICC):

جهت ارزیابی بیان پروتئین‌های *Thy-1*، *Chx10*، *Nestin*، *PAX6*، *Rhodopsin* در سلول‌های آلوده شده با ویروس حاوی ژن *PAX6*، این سلول‌ها ۶ روز پس از مجاورت با پروماین تثبیت شده و با استفاده از آزمایش ICC مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده بیان پروتئین‌های *Chx10*، *PAX6* و *Thy-1* در گروه آزمون و بیان پروتئین‌های *Rhodopsin* و *Nestin* هم در گروه آزمون و هم در گروه شاهد بود (شکل‌های ۵ و ۶).

بحث

همان‌طور که در مقدمه عنوان شد، بیماری‌هایی از قبیل ماکولای وابسته به جنس (AMD)، رتینیت پیگمنتوزا و گلوکوما که همگی شبکه چشم را درگیر می‌کنند، علل شایع نابینایی در دنیا هستند و درمان‌های مربوط به این بیماری‌ها تنها سیر صعودی آن‌ها را کند می‌کند. از این رو امروزه جهت درمان قطعی این بیماری‌ها محققان به روش‌های سلول درمانی متوسل شده‌اند. پیرو این هدف در این تحقیق سلول‌های $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف به دلیل ظرفیت بالا برای تمایز به سلول‌های عصبی انتخاب شده و ژن *PAX6(5a)* که ژن اصلی کنترل‌کننده تکوین چشم می‌باشد به این سلول‌ها با استفاده از وکتور لنتی ویروس منتقل شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القای ژن *PAX6* به سلول‌های بنیادی $CD133^+$ به دست آمده از بند ناف، باعث القای تمایز به سمت سلول‌های شبه عصبی شبکه می‌شود.

بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های شبکه نظیر *Thy-1* (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های گانگلیونی)، *Chx10* (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های دو قطبی و سلول‌های پروژنیتری شبکه) و *Rhodopsin* (به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های فتورسپتوری)، بیانگر وجود جمعیتی هتروژن از سلول‌های عصبی شبکه می‌باشد (۱۴)، (۱۳). هم‌چنین بیان مارکرهای پروژنیتری عصبی نظیر

Chx10 و *Nestin* و *PAX6* می‌تواند بیانگر وجود جمعیت‌های پروژنیتری عصبی نیز باشد. با توجه به قابلیت تکثیر بیشتر این نوع سلول‌های پروژنیتری در مقایسه با سلول‌های سوماتیک نظیر فیروبلست که در مطالعه‌های دیگر از نظر دگر تمایز به عصب مورد بررسی قرار گرفته‌اند، این موضوع یک مزیت مهم به حساب می‌آید (۱۵). هم‌چنین قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی با القای تنها یکی از ژن‌های کنترل‌کننده عصبی در مقایسه با نیاز به به کارگیری چندین فاکتور برای تمایز سلول‌های سوماتیک به سلول‌های عصبی، بیانگر قابلیت انعطاف‌پذیری بیشتر سلول‌های بنیادی در مقایسه با سلول‌های سوماتیک مطالعه شده می‌باشد (۱۶).

اگر چه ژن *PAX6* در تمام سلول‌های *Optic Cup* شبکه بیان می‌شود، ولی بیان پایدار این ژن در سلول‌های گانگلیونی و آماکراین مشاهده می‌شود (۱۷). هم‌چنین مشاهده شده که کاهش بیان *PAX6* با کاهش سلول‌های گانگلیونی و افزایش سلول‌های فتورسپتوری استوانه‌ای همراه است (۱۱). این موارد به همراه بیان واضح *Thy-1* در نمونه‌های آزمایش و عدم بیان آن در نمونه‌های کنترل، احتمالاً بیانگر تمایز به سمت سلول‌های شبه گانگلیونی می‌باشد. گرچه بیان *Nestin* در سلول‌های پروژنیتری شبکه و هم‌چنین سلول‌های گانگلیونی قابل مشاهده است و بدین ترتیب نقض‌کننده نتایج حاصل نمی‌باشد ولی بیان این مارکر در سلول‌های کنترل بیانگر عدم اختصاصیت آن و بیشتر تاییدکننده پتانسیل سلول‌های $CD133^+$ به تمایز به سمت سلول‌های با ماهیت پروژنیتری عصبی می‌باشد (۱۹)، (۱۸). بیان رودوپسین به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های فتورسپتوری هم در سلول‌های کنترل و هم سلول‌های تمایز یافته ممکن است نشان‌گر تمایز خودبه‌خودی سلول‌های $CD133^+$ آلوده نشده به سمت سلول‌های فتورسپتوری باشد زیرا مشخص شده که بیان *PAX6* با کاهش تمایز به سمت سلول‌های فتورسپتوری همراه است (۱۱). *PAX6* به موازات *Chx10* در سلول‌های پروژنیتری عصبی شبکه بیان می‌شود و مشخص شده که ژن *PAX6* اثر تنظیمی بر بیان این ژن دارد (۱۷). هر چند *Chx10* اختصاصی سلول‌های دو قطبی نیز می‌باشد ولی در این جا

احتمالاً بیان Chx10 به موازات PAX6 در نمونه‌های آزمایش و عدم بیان آن در نمونه‌های کنترل تاییدکننده وجود سلول‌های پروژنیتری عصبی شبکیه است، به این علت که بیان پایدار PAX6 همان طور که ذکر شد با افزایش تمایز به سلول‌های گانگلیونی و آمکراین و کاهش تمایز به سمت سلول‌های دو قطبی و فتورسپتوری همراه است (۱۱).

نتایج مطالعه حاضر در راستای مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۱۲ که توسط جیورگتی و همکارانش انجام گرفت می‌باشد در این مطالعه آن‌ها نشان دادند که القای SOX-2 به سلول‌های بنیادی CD133⁺ با از دست دادن ماهیت خونسازی و تبدیل به سلول‌های شبه عصبی همراه است (۲۰). ژانگ و همکارانش نیز در مطالعه‌ای نشان دادند که تیمار سلول‌های CD133⁺ با رتینوئیک اسید منجر به تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های شبه عصبی، سلول‌های آستروسیتی و الیگودندروسیت می‌شود (۲۱). در مطالعه‌ای دیگر که توسط فقیهی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام شد، مشخص شد که تیمار سلول‌های CD133⁺ با staurosporine (STS) باعث تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه عصبی و آستروسیت می‌شود (۶). اسلووینسکا و همکارانش نیز در مطالعه‌ای با مجاورت سلول‌های CD133⁺ و CD133⁻ به دست آمده از بند ناف با فاکتورهای رشدی نظیر EGF, bFGF و سپس جایگزین کردن آن با FBS نشان دادند که بین دو جمعیت سلول‌های CD133⁺ و CD133⁻ از نظر بیان مارکرهای عصبی اختلاف معناداری وجود دارد که نشان‌دهنده پتانسیل بیشتر سلول‌های CD133⁺ به سمت تمایز به سلول‌های شبه عصبی می‌باشد (۲۲). زانگیاکومی و همکاران نیز در مطالعه‌ای به نقش مؤثر جمعیت CD34⁻ بند ناف بر تمایز سلول‌های CD133⁺ به سمت سلول‌های شبه عصبی پی بردند (۲۳). با توجه به مطالعه‌ای ذکر شده نتایج مطالعه حاضر نیز تایید کننده پتانسیل سلول‌های CD133⁺ جهت تمایز به سمت سلول‌های پروژنیتری عصبی و شبه عصبی می‌باشد.

این مطالعه هم چنین با مطالعه‌های صورت گرفته که اثر ژن PAX6 را بر سلول‌های مختلف ارزیابی می‌کنند هم‌خوانی دارد. از جمله این مطالعه‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

در مطالعه‌ای که نوریوکی آزوما و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام دادند مشخص شد که با انتقال ژن PAX6 به سلول‌های اپیتلیوم پیگمانته شبکیه (RPE)، این سلول‌ها دچار دگر تمایزی شده و خصوصیات سلول‌های عصبی شبکیه را به دست می‌آورند (۲۴).

در مطالعه‌ای دیگر لاتی‌تیا کارتیر و همکارانش نشان دادند که آلوده‌سازی سلول‌های Hela با لنتی ویروس حاوی ژن PAX6، منجر به بیان آلفا ۳ توبولین عصبی و در نتیجه تغییرات مورفولوژیکی عصبی می‌شود. این مطالعه از نظر تغییرات مورفولوژیکی اعمال شده توسط ژن PAX6 با مطالعه حاضر قابل مقایسه است (۲۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر تمایز سلول‌های CD133⁺ با استفاده از تلقیح ژن PAX6 به این سلول‌ها به سمت سلول‌های پروژنیتری عصبی با در نظر گرفتن بیان مارکرهای پروژنیتری از قبیل Chx10، Nestin و PAX6 و هم چنین تمایز به سمت سلول‌های شبه گانگلیونی با در نظر گرفتن تغییرات مورفولوژیکی و بیان مارکرهای اختصاصی گانگلیون نظیر Thy-1 و PAX6 می‌باشد. جهت تایید قطعی‌تر بیان این مارکرها بهتر است که در مطالعه‌های بعدی بیان این مارکرهای مذکور به صورت مولکولی نیز بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات چشم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است.

References:

- 1- Vugler AA. Progress toward the maintenance and repair of degenerating retinal circuitry. *Retina* 2010; 30(7): 983-1001.
- 2- Osakada F, Jin ZB, Hirami Y, Ikeda H, Danjyo T, Watanabe K, *et al.* *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 17): 3169-79.
- 3- Zhao X, Liu J, Ahmad I. Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons. *Biochem Biophys Res Commu* 2002; 297(2): 177-84.
- 4- Cui YX, Kafienah W, Suleiman MS, Ascione R. A new methodological sequence to expand and transdifferentiate human umbilical cord blood derived CD133⁺ cells into a cardiomyocyte-like phenotype. *Stem Cell Rev* 2013; 9(3): 350-9.
- 5- Paspala SA, Balaji AB, Nyamath P, Ahmed KS, Khan AA, Khaja MN, *et al.* Neural stem cells & supporting cells - The new therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury. *Indian J Med Res* 2009; 130(4): 379-91.
- 6- Faghihi F, Mehranjani MS, Mehrjerdi NZ, Baharvand H. Effect of Staurosporine on Neural Differentiation of CD133⁺ Umbilical Cord Blood Cells. *Yakhteh Medical Journal* 2008; 10(1): 33-40.
- 7- Murakami Y, Ogasawara M, Sugahara F, Hirano S, Satoh N, Kuratani S. Identification and expression of the lamprey *Pax6* gene: evolutionary origin of the segmented brain of vertebrates. *Development* 2001; 128(18): 3521-31.
- 8- Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan DJ, Ruan Y, Smith J, *et al.* The level of the transcription factor *Pax6* is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 2009; 5(6): e1000511.
- 9- Cvekl A, Yang Y, Chauhan BK, Cveklova K. Regulation of gene expression by *Pax6* in ocular cells: a case of tissue-preferred expression of crystallins in lens. *Int J Dev Biol* 2004; 48(8-9): 829-44.
- 10- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, *et al.* The *Pax6* isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet* 2005; 14(6): 735-45.
- 11- Hsieh YW, Yang XJ. Dynamic *Pax6* expression during the neurogenic cell cycle influences proliferation and cell fate choices of retinal progenitors. *Neural Dev* 2009; 4(32): 1-19.
- 12- Koike-Kiriyama N, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, *et al.* Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2007; 67(4): 359-65.
- 13- Huang W, Fileta J, Guo Y, CL G. Downregulation of *Thy1* in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res* 2006; 31(3): 265-71.
- 14- Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Ploder L, Hawes NL, *et al.* Ocular retardation mouse caused by *Chx10* homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet* 1996; 12(4): 376-84.
- 15- Qiang L, Fujita R, Yamashita T, Angulo S, Rhinn H, Rhee D, *et al.* Directed conversion of Alzheimer's disease patient skin fibroblasts into functional neurons. *Cell* 2011; 146(3): 359-71.
- 16- Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araújo-Bravo MJ, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Sell Stem Cell* 2012; 10(4): 465-72.
- 17- Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, *et al.* *PAX6* expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* 1999; 83(6): 723-7.
- 18- Qiu G, Seiler MJ, Thomas BB, Wu K, Radosevich M, Sadda SR. Revisiting nestin expression in retinal progenitor cells *in vitro* and after transplantation *in vivo*. *Exp Eye Res* 2007; 84(6): 1047-59.
- 19- Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N. Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech Dev* 1999; 94(1-2): 287-91.
- 20- Giorgetti A, Marchetto MC, Li M, Yu D, Fazzina R, Mu Y, *et al.* Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of *Sox2* and *c-Myc*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(31): 12556-61.
- 21- Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon B, Yang YS, Yang SE, *et al.* Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2003; 75(4): 573-84.
- 22- Slovinska L, Novotna I, Kubes M, Radonak J, Jergova S, Cigankova V, *et al.* Umbilical cord blood cells CD133⁺/CD133⁻ cultivation in neural proliferation media differentiates towards neural cell lineages. *Arch Med Res* 2011; 42(7): 555-62.
- 23- Zangiacomi V, Balon N, Maddens S, Lapierre V, Tiberghien P, Schlichter R, *et al.* Cord blood-derived neurons are originated from CD133⁺/CD34 stem/progenitor cells in a cell-to-cell contact dependent manner. *Stem Cells Dev* 2008; 17(5): 1005-16.
- 24- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, *et al.* Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the *Pax6* transcriptional factor. *Hum Mol Genet* 2005; 14(8): 1059-68.
- 25- Cartier L, Laforge T, Feki A, Arnaudeau S, Dubois-Dauphin M, Krause KH. *Pax6*-induced alteration of cell fate: shape changes, expression of neuronal a tubulin, postmitotic phenotype, and cell migration. *J Neurobiol* 2006; 66(5): 421-36.

Original Article

Retinal cells development through transfection of CD133⁺ HSC derived from human cord blood by PAX6 master gene

Balagholi S.^{1,2}, Amini Kafi-Abad S.¹, Soheili Z.S.³, Samiee Sh.¹, Ahmadiyeh H.⁴,
Rezaie Kanavi M.⁴, Nikougoftar Zarif M.¹, Daftarian N.⁴

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

²Tehran Regional Educational Blood Transfusion Center, Tehran, Iran

³National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

⁴Ophthalmic Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Cord blood CD133⁺ stem cells are highly proliferative primitive hematopoietic progenitors. These cells can also differentiate to other cells especially neural cells. The PAX6 gene belongs to a family of genes that play a critical role in the formation of tissues and organs during embryonic development. The PAX6 protein is thought to activate genes involved in the formation of the eyes, brain and spinal cord (central nervous system), and the pancreas. The purpose of this study was to assess PAX6 (5a) gene transfer in cord blood CD133⁺ stem cells and evaluate its effect on differentiation.

Materials and Methods

In this experimental study, cord blood stem cells were collected and mononuclear cells isolated by ficoll; then, CD133⁺ cells were obtained using the CD133 MicroBead Kit in combination with the autoMACS Separator. These cells were cultured in Stem Span media. Next, HEK293T packaging cells were co-transfected with PLEX-MCS, PsPAX2, and pMD2G by calcium phosphate method. Lentiviral vectors were collected and concentrated. The appropriate amount of viruses was used to infect CD133⁺ cells. The successful transduced cells were selected by puromycin resistance. After two weeks, the expression of Rhodopsin, CHX10, Thy1, Nestin, and PAX6 proteins was assessed by immunocytochemistry method.

Results

Two weeks after infection, the expression of Rhodopsin, CHX10, Thy1, Nestin, and PAX6 proteins were detected in treatment cells and the expression of Rhodopsin and Nestin in control cells.

Conclusions

The results showed CD133⁺ cells differentiated into progenitor neural like cells and retinal neural like cells including ganglion like cells.

Key words: PAX6 protein, CD133 antigen, Cord Blood

Received: 26 Apr 2014

Accepted: 28 Feb 2015

Correspondence: Amini Kafi-Abad S., MD. Pathologist. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601558; Fax: (+9821) 88601542
E-mail: s.amini@ibto.ir