

بررسی الگوی متیلاسیون و بیان ژن APC به دنبال تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به رده استئوبلاستی

رجاء الحذیفی^۱، علی دهقانی فرد^۲، دکتر سعید کاویانی^۳، دکتر مهرداد نوروزی نیا^۴، سمیرا رضایی^۵، دکتر مهدی آزاد^۶، دکتر مانده مشهدی خان^۷، دکتر سعید سلالی^۸

چکیده

زمینه و هدف: فرایندهای مختلفی روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) به سلول‌های استئوبلاستی تاثیر می‌گذارند که در این میان، مسیر پیام رسان Wnt حائز اهمیت ویژه ای است. در این مسیر پیام رسان، مولکول APC به عنوان کنترل کننده منفی Wnt عمل می‌کند که با اتصال به β -catenin سبب تجزیه این مولکول می‌گردد. لذا در این تحقیق به تخمین ارتباط متیلاسیون DNA با بیان ژن APC یا Adenomatous Polyposis Coli طی تمایز استئوبلاستی پرداخته شد.

روش بررسی: در این مطالعه ی تجربی، پس از جدا سازی و تکثیر MSCs، القای تمایز استئوبلاستی صورت گرفت. به منظور تایید تمایز استئوبلاستی از رنگ آمیزی آلپزارین رد و بیان شاخص های تمایزی شامل آلکالین فسفاتاز (ALP) و استئوکلسین استفاده گردید. وضعیت متیلاسیون ژن APC با روش (MSP یا Methylation-Specific PCR)، وضعیت بیان ژن APC با استفاده از Real time PCR در روزهای مختلف تمایزی ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی آلپزارین رد و بیان شاخص های ALP و استئوکلسین تایید کننده تمایز استئوبلاستی بود. نتایج حاکی از کاهش معنی دار بیان ژن APC در روز ۷ تمایز استئوبلاستی بود ($P < 0.05$). همچنین نتایج نشان دهنده ی هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن APC طی تمایز استئوبلاستی بود.

نتیجه‌گیری: کاهش بیان ژن APC می‌تواند در کنترل مسیر سیگنالی Wnt طی تمایز MSC مشتق از مغز استخوان به رده استئوبلاستی در مراحل مختلف نقش موثری ایفا کند. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده، متیلاسیون پروموتور ژن APC نقش مهمی در کنترل بیان این ژن به عهده دارد.

واژه‌های کلیدی: تمایز استئوبلاستی، ژن APC، متیلاسیون

* نویسنده مسئول :

دکتر سعید کاویانی؛

دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Email :

kavianis@modares.ac.ir

- دریافت مقاله : آذر ۱۳۹۴ پذیرش مقاله : اسفند ۱۳۹۴

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) یا Mesenchymal Stem Cells از جمله سلول‌های

بنیادی چند قوه‌ای با توان تکثیر، خودنوسازی و تمایز بالا هستند که از بافت‌های مختلف از جمله بافت مغز استخوان قابل جداسازی می‌باشند. قدرت تمایزی این سلول‌ها به رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های استئوبلاستی، آدیپوسیتی و کندروسیتی در محیط‌های Invivo و Exvivo مورد بررسی قرار گرفته است (۱-۳).

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ دانشجوی دکتری تخصصی هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صادم، بیمارستان فوق تخصصی صادم، تهران، ایران

^۳ دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۴ دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۵ کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صادم، بیمارستان فوق تخصصی صادم، تهران، ایران

^۶ اسنادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشکده علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۷ دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صادم، بیمارستان فوق تخصصی صادم، تهران، ایران

^۸ اسنادیار هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشکده علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

است، پایدار شده و به هسته می‌رود و در نهایت با فاکتورهای رونویسی LEF/TCF هتروداایمر تشکیل می‌دهد و رونویسی از ژن‌های هدف Wnt را تنظیم می‌کند (۷-۵).

در سال‌های اخیر، نقش مهم مسیر سیگنالی Wnt کانونیکال در کنترل استئوژنز و شکل‌گیری بافت استخوانی مشخص شده است. مسیر سیگنالی Wnt کانونیکال دارای اهمیت ویژه‌ای در تمایز رده‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به دوز سیگنالینگ catenin- دارد. پروتئین APC به عنوان تنظیم‌کننده اصلی عملکرد catenin- ایفای نقش می‌کند. دیده شده است که خاموشی بیان ژن APC با استفاده از RNA مداخله‌گر (small interfering RNA) اختصاصی این ژن می‌تواند سبب افزایش پیام‌دهی در مسیرهای سیگنالی Wnt/ catenin- و BMP/Smad گردد. البته فرایند knockdown کردن ژن APC می‌تواند سبب مهار کامل تمایز استئوبلاستی گردد (۸). از طرفی دیده شده است که طی فرایند تمایز استئوبلاستی، مهار بیان ژن APC با استفاده از MicroRNA (miR) می‌تواند سبب افزایش سیگنالینگ Wnt کانونیکال از طریق پایدار سازی catenin- و در نتیجه القای تمایز استئوبلاستی گردد (۹).

تغییرات اپی ژنتیکی در DNA و هیستون‌ها، نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارند. یکی از این مهمترین تغییرات اپی ژنتیکی در پستانداران، متیلاسیون DNA است که بر روی نوکلئوتیدهای سیتوزین که قبل از نوکلئوتید گوانین قرار گرفته‌اند و بنام دی نوکلئوتید CpG معروفند، صورت می‌گیرد. عموماً وضعیت هیپومتیلاسیون با افزایش بیان، و وضعیت هیپرمتیلاسیون با کاهش یا خاموشی بیان همراه است. متیلاسیون به علت اینکه تغییری در توالی DNA ایجاد نمی‌کند، برگشت‌پذیر است و در عین حال از سلولی

استئوپورز به واسطه کاهش توده استخوانی و افزایش شکنندگی استخوان‌ها مشخص می‌شود. ۵۰ درصد زنان و ۲۰ درصد مردان بالای ۵۰ سال در معرض ابتلا به استئوپورز قرار دارند. این عارضه سالانه هزینه‌های درمانی بسیار بالایی را به خود اختصاص می‌دهد. درمان‌های رایج استئوپورز به واسطه مهار بازجذب استخوان از طریق مهار تمایز استئوکلاستها و فعالیت آنها صورت می‌گیرد. اما اینگونه درمان‌ها تنها بازجذب استخوان را مهار کرده و نمی‌توانند منابع استخوانی از دست رفته را احیا کنند. در مقابل، داروهایی توسعه پیدا کرده‌اند که مکانیسم اثر آنها به واسطه‌ی افزایش استخوان‌سازی و مهار فعالیت استئوکلاست‌هاست. بنابراین شناخت مکانیسم‌های دخیل در تمایز استئوبلاستی به منظور انجام تمایز موثر، حائز اهمیت خواهد بود (۴).

مسیر سیگنالی Wnt یک مسیر سیگنالی پیچیده متشکل از گلیکوپروتئین‌های ترشحی غنی از سیستئین است که در فرایندهای مختلف سلولی از قبیل امپریوژنز، تمایز و تکثیر سلولی، سرطانی‌شدن سلول‌ها، آپوپتوز و سرنوشت سلولی ایفای نقش می‌کند. حدود ۱۹ نوع پروتئین Wnt در پستانداران شناسایی شده است که این پروتئین‌ها به گیرنده و کمک گیرنده خود متصل شده است و چندین آبشار پیام‌رسان داخل سلولی را فعال می‌کنند. تا کنون دو نوع مسیر سیگنالی کانونیکال (Wnt/ catenin-) و غیرکانونیکال معرفی شده‌اند. در مسیر کانونیکال و در غیاب مولکول Wnt، کمپلکس پروتئینی متشکل از گلیکوژن سنتتاز کیناز (GSK3b) و سبب Adenomatous Polyposis Coli (APC) فسفریلاسیون و از بین رفتن axin و catenin- می‌شود. در حالی که در حضور لیگاند Wnt، catenin- که از مولکول‌های کلیدی داخل سلولی

استفاده از محلول نمکی متعادل (HBSS یا Hank's Balanced Salt Solution) حجم نمونه‌ها به ۲۵ ml رسانده شد. در یک فالكون دیگر، ۲۰ ml محلول فایکول ریخته شد و بعد بافر HBSS حاوی مغز استخوان به آزامی به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از جمع‌آوری لایه سلولی ما بین فایکول و HBSS، آنرا به یک لوله فالكون ۵۰ ml دیگر منتقل کرده و سپس ۳ بار شستشو با بافر HBSS انجام شد. پلاک سلولی حاصل، در ۲۵ ml محیط کشت DMEM-Low Glucose (Gibco) کشت داده شد. برای شمارش سلولی و تعیین درصد زنده بودن (Viability)، سلول‌ها، ۱۰ μl از سوسپانسیون سلولی حاصله را با ۱۰ μl تریپان بلو مخلوط کرده و با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری شمارش سلولی انجام داده شد. نتایج شمارش سلولی نشان می‌داد که درصد زنده بودن سلول‌ها حدود ۸۰٪ می‌باشد. بقیه محیط کشت حاوی سلول‌ها به فلاسک کشت TV۵ منتقل گردید. فلاسک به انکوباتور ۳۷°C حاوی ۵٪ CO2 منتقل شد. شستشو و تعویض محیط به مدت ۸ روز و در روزهای زوج انجام شد. زمانی که تراکم (Confluency) سلولی به حدود ۷۰٪ رسید، سلول‌ها پس از ترپسینه شدن جمع‌آوری شده و به فلاسکهای کشت دیگری جهت تکثیر (Expansion) منتقل شدند.

فلوسیتومتری

برای بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تأیید آنها توسط فلوسیتومتری، از سلول‌های کشت داده شده در پاساژ دوم استفاده گردید. سلول‌های MSCs، ترپسینه شده و بعد از شستشو با PBS و شمارش سلولی، حدود ۱۰^۶ سلول در یک میلی‌لیتر PBS حل کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از

به سلول دیگر به ارث می‌رسد. متیلاسیون دی نوکلئوتید CpG در ناحیه پروموتوری برخی از ژن‌های سرکوبگر تومور (TSGs یا Tumor Suppressor Genes) در ژنوم یوکاریوتها، یک مکانیسم اصلی اپی ژنتیک در غیرفعال شدن این ژن‌هاست. اضافه شدن گروه متیل روی CpG توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز (DNMT) صورت می‌گیرد و دهنده‌ی گروه متیل، مولکول S-آدنوزیل متیونین می‌باشد. خاموشی وابسته به متیلاسیون در ژن‌های دخیل در فرایندهایی مانند ترمیم DNA، تنظیم چرخه سلولی، اتصالات و پیام‌رسانی سلولی در سلول‌های سرطانی دیده شده است (۱۰). با توجه به نقش مسیر کانونیکال در سرطان، الگوی متیلاسیون آن در بسیاری از سرطان‌ها بررسی شده است؛ به خصوص پس از آنکه مشخص شد در مواردی از سرطانها، تنها دلیل تغییرات بیان ژن تغییرات اپی ژنتیکی نقش دارد. برای مثال، در سرطان پستان، هیپرمتیلاسیون APC باعث ایجاد نقص در مسیر سیگنال‌دهی شده است (۱۱).

با توجه به مطالب پیشگفت، هدف این تحقیق تعیین تغییر الگوی بیانی ژن APC طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی و تعیین نقش متیلاسیون DNA در تغییر بیان ژنی از طریق ارتباط بیان این ژن با تغییر الگوی متیلاسیون در پروموتور ژنی می‌باشد.

روش بررسی

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون

مغز استخوان

حدود ۲ میلی‌لیتر از مغز استخوان انسانی از اهدا کننده‌ی سالم از بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهیه گردید و در یک لوله هپارینه به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد. سپس با

رنگ آمیزی آلیزارین رد

تمایز سلول‌های MSC به رده استئوبلاستی در پلیت شش خانه‌ای انجام شد و در نهایت در روز ۲۱ تمایزی، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد انجام گرفت. بدین ترتیب که پلیت از انکوباتور خارج شد و سپس چاهک‌ها دو بار با PBS شستشو گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر فرمالدهید ۴۰٪ به عنوان ثابت کننده به هر چاهک اضافه شد و سلول‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در دمای اتاق کف چاهک‌ها ثابت گردیدند. در ادامه، فرمالدهید را خارج کرده و چاهک‌ها مجدداً دو بار با PBS شستشو شدند و ۲ میلی‌لیتر از محلول آلیزارین رد ۱٪ را به هر چاهک اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس چاهک‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و در زیر میکروسکوپ نوری، رنگ گرفتن سلول‌های استئوبلاستی در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته مقایسه شد.

استخراج DNA

سلول‌های MSC و سلول‌های استئوبلاستی را در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایزی توسط تریپسین از کف فلاسک جدا کرده و سپس با استفاده از PBS شستشو داده شد و بعد از سانتریفیوژ، پلاک سلولی را بر اساس پروتکل کیت شرکت Roche (Roche Applied Science, Vilvoorde, Belgium) در ۲۰۰ میکرولیتر PBS به صورت محلول درآمد. در ادامه، ۲۰۰ میکرولیتر از Binding Buffer و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K را روی آن اضافه شد و در ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید و سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل روی آن ریخته و مخلوط گردید. این مخلوط روی ستون برده شد و بعد از سانتریفیوژ، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر Inhibitor Buffer به آن اضافه گردید و یک دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ کرده و سپس با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر مخصوص شستشو، عمل شستشو دو بار انجام شد. در

سوسپانسیون سلولی به لوله‌ها منتقل شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادیهای مونوکلونال کونژوگه شده با فلورسین ایزوتیوسیانیات (FITC) یا فیکواریترین (PE) شرکت داکو (DAKO, Carpinteria, CA, USA) به هر میکروتیوب اضافه شد و یک ساعت روی یخ و در تاریکی قرار گرفت و سپس دو بار با PBS حاوی ۲٪ BSA شستشو داده و سپس سانتریفیوژ گردید. پلاک سلولی را در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حل کرده و سپس آنالیز فلوسیتومتری انجام شد. در این بررسی شاخصهای CD44، CD13 و CD34 با فلورسین ایزوتیوسیانیات و شاخص های CD166، CD105 و CD14 با فیکواریترین نشاندار شده بودند.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست

پس از اینکه سلول‌ها حدود ۶۰-۳۰٪ فلاسک T75 را پر کردند، تمایز سلول‌ها آغاز گردید. بدین ترتیب که محیط کشت رویی سلول‌ها را خارج کرده و محیط تمایزی استئوبلاستی اضافه شد. این محیط تمایزی شامل محیط کشت DMEM High Glu (Gibco:31966) یا Dulbecco's Modified Eagle Medium و Dexamethasone (Sigma:D4902) با غلظت ۰/۱ میکرومولار و L-Ascorbic Acid 2-phosphate و Sesquimagnesium Salt Hydrate (Sigma:A8960) و با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و Glycerophosphate Disodium Salt Hydrate (Sigma:G9891) با غلظت ۱۰ میکرومولار به همراه ۱۰ درصد محیط کشت (Gibco:10270-106) (FBS) یا Fetal Bovine Serum) بود. برای بررسی تغییرات الگوی بیانی ژنها، کشت در محیط تمایزی به مدت ۳ هفته انجام شد و سلول‌ها در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایزی مورد بررسی قرار گرفتند.

تا DNA ته ميكروتيوب رسوب كند. مايع رويي تخليه شده و ۴۰۰ ميكروليتر الكل ۷۰٪ اضافه گرديد. مجدداً با سرعت ماكزيمم در دماي ۶°C براي ۳۰ دقيقه نمونه سانترفوژ شد. مايع رويي تخليه شده و زير هود در ميكروتيوب را براي مدت كوتاهي حدود ۵ دقيقه باز گذاشته شد تا قطرات آب و الكل باقي مانده كاملاً خشك شوند. در نهايت به تيوب ۳۰ ميكروليتر آب مقطر ديونيزه اضافه شد. DNA حاصل تك رشته‌اي و بسيار حساس است و بايد سريعاً آن را در ۲۰°C- ذخيره كرد.

واكنش زنجيره‌اي پليمرز (PCR)

PCR روش تكثير DNA است كه بوسيله آن مي‌توان از قسمت خاصي از ژنوم به طور اختصاصي و انتخابي $10^9 - 10^6$ نسخه تهيه كرد. هر سيكل PCR شامل مراحل واسرشت سازي (Denaturation)، اتصال آغازگرها (Annealing) و طويل شدن (Extension) است. در مرحله واسرشت سازي، مولكول دو رشته‌اي الگو از هم باز شده و در مرحله اتصال آغازگرها، پرايمرها به جايگاههاي اختصاصي خود متصل شدند و در مرحله طويل سازي، آنزيم Taq پليمرز، نوكلئوتيدها را در جهت ۳' → ۵' پليمريزه مي‌كند. براي راه اندازي (MSP يا Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) ابتدا شرايط يك PCR استاندارد براي يافتن دماي اتصال اپتيمم با توجه به T_m پرايمرها، گراډيان دما از ۵۸-۶۲ درجه سانتي گراد در نظر گرفته شد. در نهايت در دماي ۵۹ درجه سانتي گراد باند اختصاصي روي ژل آگارز ۱/۳٪ برده شد و با رنگ آميزي اتيديم برمايد مشاهده گرديد.

انجام PCR با استفاده از پرايمرهای اختصاصي متيله و غيرمتيله روي DNA استخراج شده از سلول‌ها در روزهای ۰ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمايز استنوبلاستي بدین

نهایت ۲۰۰ ميكروليتر از Elution Buffer كه از قبل گرم شده بود روي ستون ريخته و شستشو داده شد تا DNA به صورت محلول به دست آيد.

بي سولفايد كردن DNA

در مرحله اول ۱۰ ميكروليتر نمونه DNA به ۴۰ ميكروليتر آب مقطر ديونيزه در يك ميكروتيوب ۱/۵ اضافه شد. سپس ۵/۵ ميكروليتر NaOH ۲ مولار به آن افزوده و ۱۵ دقيقه در ۳۷°C انكوبه شد. اين مرحله باعث تك رشته‌اي شدن DNA مي‌شود. براي عمل سدیم بي سولفايد، DNA تك رشته لازم است. بنا بر این، ۳۰ ميكروليتر هيدروكينون ۱۰ ميلي مولار تازه تهيه شده اضافه شد. هيدروكينون يك آنتي اكسيدان است كه از اكسيداسيون اشكال حد واسط ايجاد شده طی واكنش بي سولفايد جلوگيري مي‌كند. سپس ۵۲۰ ميكروليتر سدیم بي سولفايد ۳ مولار به تيوب اضافه گرديد. در ادامه به كمك روغن معدني سطح محلول را پوشانده و به كمك نوار پارافيلم در ميكروتيوب محكم شد. سپس ۱۶ ساعت انكوباسيون در بن ماري ۵۰°C جهت انجام عمل سولفوناسيون انجام گرفت. در مرحله دوم روغن موجود در سطح محلول به آرامي به كمك سمپلر جدا شده و دور ريخته شد. DNA با استفاده از كيت شركت كياژن (Qiagen Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA) از محلول استخراج شد. ۵/۱۵ ميكروليتر از NaOH ۳ مولار اضافه شده و ۵ دقيقه در دماي اتاق انكوبه شد. اين مرحله با انجام دسولفوناسيون، تبديل شيميايي سيتوزين به يوراسيل را كامل مي‌كند. ۳ ميكروليتر گليكوژن و ۵۱ ميكروليتر استات آمونيوم ۱۰ مولار و ۳ حجم اتانول ۱۰۰٪ سرد به نمونه اضافه شده و دو ساعت در ۲۰°C- انكوبه شد. اين مرحله براي رسوب دادن DNA لازم است. نمونه را با دور ۱۶۰۰۰g در دماي ۴C براي ۳۰ دقيقه سانترفوژ کرده

روی DNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی و مراحل عنوان کنترل مثبت غیرمتیله و سلول‌های لاین سلولی MKN-45 به عنوان کنترل مثبت متیله استفاده شد.

صورت بود که بعد از انجام مرحله تیمار بی‌سولفاید مختلف تمایز استئوبلاستی، از این DNA جهت انجام PCR استفاده گردید. در این آزمایش، نمونه DNA سلول‌های لوکوسیتی تک‌هسته‌ای خون محیطی به

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام ژن APC

Gene	Primer	Forward	Reverse	Size
APC	M	TATTGCGGAGTGC GGGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	100
	U	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGTT	CCAATCAACAAACTCCCAACAA	110

سلول استفاده شد. سپس سنتز مولکول cDNA با استفاده از تکنیک RT-PCR (Fermentas, Lithuania) روی RNA های استخراج شده انجام گرفت. در ادامه به منظور بررسی کمی بیان ژن APC از روش SYBR green real-time PCR (Qiagen Kit, Valencia, CA) استفاده شد. در جدول ۱ توالی پرایمرهای مورد استفاده در انجام Real-time PCR ژن‌های APC و HPRT نشان داده شده است. پرایمرهای مذکور با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی گردید. به منظور نرمالیز کردن نتایج به دست آمده، از ژن HPRT به عنوان یک Housekeeping Gene استفاده شد.

جدول ۱ به توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام MSP اشاره دارد. طراحی پرایمرهای مذکور با استفاده از نرم افزار MethPrimer انجام گردید.

انجام Real time PCR جهت بررسی کمی میزان

بیان ژن مسیر Wnt

جهت بررسی بیان ژن APC از تکنیک Quantitative real-time PCR استفاده شد. در ابتدا در روزهای ۰ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی، سلول‌ها جمع‌آوری و با PBS شسته شده و در نهایت مراحل استخراج RNA سلول‌ها به کمک کیت استخراج RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA) انجام گرفت. به منظور استخراج RNA، از حدود 1×10^6

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام Real time PCR ژن‌های APC و HPRT

Primer	Forward	Reverse	Size
APC	GCAACTGGGTCTGACATGAACA	TGAGCATGGCAAAGTCTGATTATAC	91
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	94

استئوبلاستی است که در آن بیان شاخص‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین به ترتیب به عنوان شاخص‌های ابتدایی و انتهایی تمایز استئوبلاستی، در سلول‌های استئوبلاستی در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی بررسی می‌گردد (۱۲).

انجام RT-PCR جهت بررسی بیان شاخص‌های آلکالین فسفاتاز (ALP) و استئوکلسین (Osteocalcin) آزمون RT-PCR برای بررسی بیان شاخص‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین بر روی DNA استخراج شده از سلول‌های استئوبلاستی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام گرفت. هدف این آزمون تایید تمایز

جدول ۳: پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام MSP ژن های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین

Primer	Forward	Reverse	Size
ALP	GCA CCT GCC TTA CTA ACT C	AGA CAC CCA TCC CAT CTC	161
Osteocalcin	TCA CAC TCC TCG CCC TAT TGG	GAT GTG GTC AGC CAA CTC GTC A	260

نرم افزار Microsoft® Excel 2010 و SPSS و با استفاده از آزمون T-test انجام گرفت. همچنین نتایج به دست آمده حاصل تکرار ۳ نمونه متفاوت ($\pm SD$) می باشند. از نظر آماری نیز مقدار $p < 0.05$ معنی دار محسوب می شود.

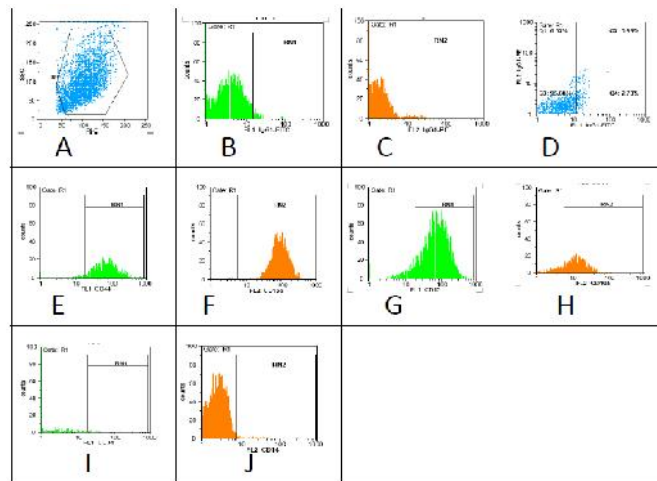
پرایمرهای مذکور جهت انجام PCRRT- با استفاده از نرم افزار Primer3 طراحی گردید. مقادیر نسبی به دست آمده بر اساس روش CT بوده و با استفاده از فرمول 2^{-CT} محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری نیز با استفاده از

یافته ها

نتایج حاصل از فلوسیتومتری

آنتی ژن های CD34 و CD14 منفی هستند، اما شاخص های CD44، CD166، CD13 و CD105 را بیان می کنند. بیان شاخص های CD34 و CD14 به ترتیب ۱/۰۵٪ و ۰/۶۸٪ بوده، در حالی که بیان شاخص های CD44، CD166، CD13 و CD105 به ترتیب ۹۳/۷۴، ۹۹/۱۹، ۹۰/۸۶٪ و ۸۰/۱۳٪ می باشند.

نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان دهنده بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی در سلول های جدا شده از مغز استخوان می باشد و این تاییدکننده کیفیت جداسازی سلول های MSCs و حذف سلول های هماتوپوئیتیک است. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود این سلول ها از نظر بیان

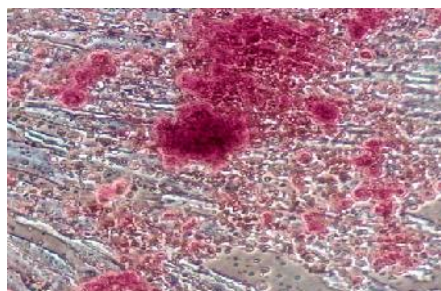


شکل ۱: نتایج حاصل از فلوسیتومتری جهت بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی در سلول های جدا شده از مغز استخوان. بخش A نشان دهنده اندازه و گرانبه سلول های آنالیز شده است و بخش های B, C و D نشان دهنده کنترل منفی هستند. بخش های E تا J به ترتیب نشان دهنده بیان شاخص های CD44، CD166، CD13، CD105 و CD34، CD14 می باشند

نتایج حاصل از تمایز استئوبلاستی

با به کار بردن محیط تمایزی استئوبلاستی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی تمایز داده شدند و سپس در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ جمع‌آوری سلول‌ها انجام گرفت. نتیجه رنگ‌آمیزی

آلیزارین رد نشان‌دهنده‌ی رسوب کلسیم در سلول‌ها بوده و این آزمایش تاییدکننده‌ی تمایز استئوبلاستی است. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود رسوب کلسیم مشاهده شده تاییدکننده تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت استئوبلاست می‌باشد.

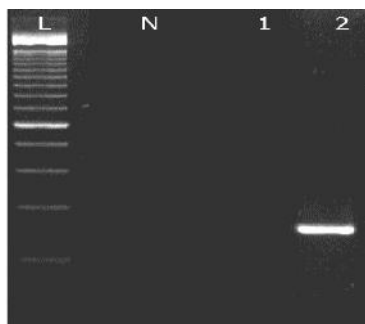


شکل ۲: رنگ آمیزی آلیزارین رد سلول‌های استئوبلاستی. رسوب مشاهده شده مربوط به کلسیم در سلول‌های استئوبلاستی طی ۲۱ روز تمایز می‌باشد

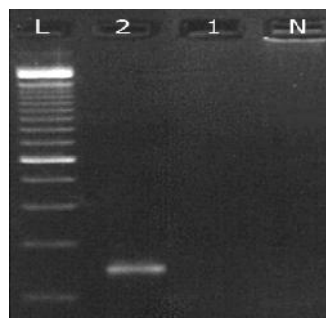
نتایج حاصل از RT-PCR ژن‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین

برای تایید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست علاوه بر رنگ‌آمیزی آلیزارین از مارکرهای اختصاصی رده استئوبلاستی نیز استفاده شد. آلکالین فسفاتاز از شاخص‌های اولیه تمایز استئوبلاستی و استئوکلسین از شاخص‌های انتهایی

تمایز استئوبلاستی هستند و از این دو شاخص برای بررسی تمایز استئوبلاستی استفاده می‌گردد. نتایج حاصل از RT-PCR ژن‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین در شکل ۳ مشاهده می‌شود. این شاخص‌ها در سلول‌های استئوبلاستی بیان شده، در حالی که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان نمی‌شود و این امر تاییدکننده‌ی تمایز استئوبلاستی می‌باشد.



ب



الف

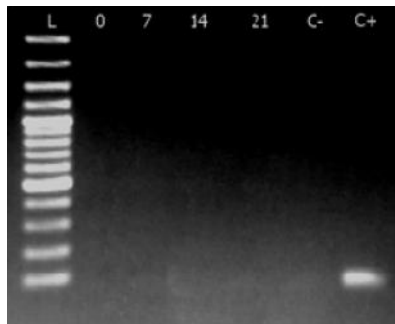
شکل ۳: نتایج حاصل از بیان شاخص‌های اختصاصی تمایز استئوبلاستی. الف: اندازه باند آلکالین فسفاتاز که ۴۴۰bp می‌باشد. ب: اندازه باند استئوکلسین که ۱۴۱bp می‌باشد

سلول‌های بنیادی مزانشیمی یا MSC: ۱: تمایز نیافته: ۲: روز ۲۱ تمایز استئوبلاستی L: Ladder 100 N: کنترل منفی

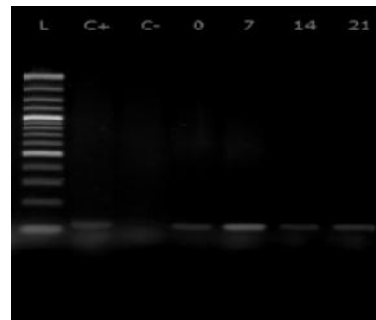
آزمایش روی نمونه‌ی DNA استخراج شده از خون محیطی که تحت تیمار بی‌سولفاید قرار گرفته بودند، انجام شد. نتایج حاصل از راه‌اندازی تکنیک MSP برای پرایمر APC غیرمتیله و متیله در شکل ۴ آمده است.

نتایج حاصل از MSP روی سلول‌های MSCs و استئوبلاستها

در این مطالعه، متیلاسیون جزایر CpG در پروموتور ژن APC به کمک تکنیک (MSP یا Methylation-Specific PCR) بررسی شد. برای راه‌اندازی و تعیین شرایط مناسب PCR انجام مراحل



ب



الف

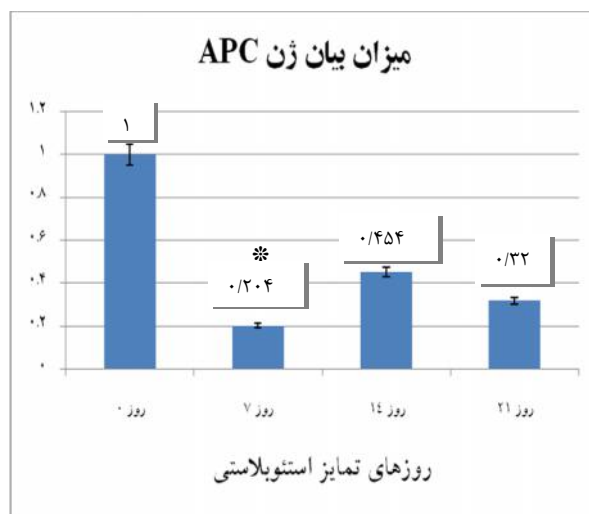
شکل ۴: نتایج حاصل از MSP سلول‌های MSC تمایز نیافته و سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته با استفاده از پرایمرهای متیله (M) و غیر متیله (U). الف: نتایج حاصل از MSP با پرایمرهای متیله روی ژل آگارز در روزهای ۰ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی. همانگونه که مشاهده می‌شود باند متیله در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی و همچنین MSC تمایز نیافته (روز ۰) وجود دارد. در اینجا از DNA تیمار بی‌سولفیت شده فون ممیطی به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (C+). همچنین C- مربوط به کنترل منفی می‌باشد. ب: نتایج حاصل از MSP با پرایمرهای غیر متیله روی ژل آگارز در روزهای ۰ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی. همانگونه که نشان داده شده است باند غیرمتیله در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی و همچنین MSC تمایز نیافته (روز ۰) وجود دارد. تیمار بی‌سولفیت شده لاین سلولی MKN-45 به عنوان کنترل مثبت (C+) و همچنین C- مربوط به کنترل منفی می‌باشد

کاهش بیان این ژن در روز ۷ از تمایز استئوبلاستی به طور معنی‌دار و به میزان ۰/۲۰۴ در مقایسه با روز ۰ تمایزی مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$). این در حالی است که این کاهش بیانی در روزهای ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی به ترتیب به میزان ۰/۴۵۴ و ۰/۳۲۰ مشاهده شد که معنی‌دار نبود.

نتایج حاصل از بیان ژن APC در روزهای مختلف تمایز استئوبلاستی با استفاده از تکنیک

Real time PCR

نتایج حاصل از آنالیز کمی بیان ژن APC در روزهای ۰ و ۷ و ۱۴ و ۲۱ از تمایز استئوبلاست با استفاده از تکنیک Quantitative Real Time PCR در شکل ۵ نشان داده شده است. با توجه به این نتایج،



شکل ۵: نتایج بررسی کمی بیان ژن APC در مقابل ژن HPRT به عنوان کنترل داخلی با استفاده از تکنیک Real-time PCR در گروه های مورد مطالعه. محور عمودی بیانگر افزایش نسبی بیان ژنی در مقایسه با گروه کنترل (MSC) پس از نرمالیز کردن با بیان ژن HPRT می باشد

* $p < 0.05$ در مقابل سلول های گروه MSC می باشد

بحث

موشی توسط RNA مداخله گر ریز (Small Interfering RNA) اختصاصی علیه ژن APC، می تواند سبب افزایش پیام رسانی دو مسیر سیگنالی Wnt/-catenin و BMP/Smad گردد و در عین حال این کار سبب مهار کامل تمایز استئوبلاستی شود. البته در تحقیق حاضر نشان داده شده است که القای مسیر سیگنالی BMP از طریق افزودن غلظت های بالای BMP-7 به محیط کشت تمایز استئوبلاستی می تواند سبب غلبه بر مهار تمایز استئوبلاستی گردد (۴).

در مطالعات دیگر نیز به بررسی نقش فاکتورهای رونویسی مختلف طی تمایز استئوبلاستی پرداخته شده است. در یک مطالعه به بررسی اهمیت فاکتور رونویسی RUNX2 در تمایز استئوبلاستی در محیط کشت استئوژنیک حاوی اسید زولدرونیک (Zoledronic Acid) پرداخته شده است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده اهمیت نقش APC در کنترل تمایز استئوبلاستی از طریق اثر بر مسیر سیگنالی Wnt می باشد. ژن APC به عنوان یک ژن سرکوبگر تومور از طریق اتصال به -catenin سبب تخریب این مولکول و در نتیجه کاهش پیام رسانی Wnt می گردد (۹). در تحقیق حاضر نشان داده شد که طی تمایز استئوبلاستی، میزان بیان ژن APC کاهش می یابد که این می تواند سبب افزایش پایداری -catenin و در نتیجه افزایش پیام رسانی مسیر Wnt گردد. بررسی های بیشتر روی بیان ژن -catenin طی تمایز استئوبلاستی می تواند مؤید نوع ارتباط -catenin و APC در مسیر سیگنالی Wnt باشد. تحقیقات مختلف حاکی از نقش ژن APC در بازگردش -catenin در مسیر سیگنالی Wnt می باشند. مشخص شده است که سرکوب بیان ژن APC خط سلولی KS483 مربوط به سلول های بنیادی مزانشیمی

از هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن APC در هفته‌های اول و دوم و سوم (روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱) تمایز استئوبلاستی و در سلول‌های تمایز نیافته MSC می‌باشد. این در حالی است که کاهش بیان ژن APC در روزهای مختلف تمایز استئوبلاستی با وضعیت متیله در پروموتور ژن APC همراه است. بنابراین، به نظر می‌رسد که هایپرمتیلاسیون پروموتور ژن APC نقش مهمی در کنترل بیان این ژن طی تمایز استئوبلاستی داشته باشد. همچنین با توجه به یافته‌های به دست آمده از این تحقیق احتمالاً سایر مکانیسم‌های اپی ژنتیکی از قبیل تغییرات اپی ژنتیکی هیستونی بتوانند در کنترل بیان ژن APC طی تمایز استئوبلاستی ایفای نقش کنند. در یک مطالعه مشخص شد که افزایش بیان ژن ROR2 طی تمایز استئوبلاستی با کاهش متیلاسیون پروموتور ژنی از روز ۸ تا روز ۲۱ تمایز همراه می‌باشد (۱۶). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شده است که افزایش بیان ژن Osterix (OSX) طی تمایز استئوبلاستی و به ویژه در روزهای ۱۴ و ۲۱ تمایزی با وضعیت هیپومتیلاسیون پروموتور این ژن در تمامی روزهای تمایزی بررسی شده شامل روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ به دنبال تیمار سلول‌های استئوبلاستی با داروی اسید زولدرونیک همراه است (۱۷). علاوه بر این، ضمن افزایش بیان RUNX2، DLX و BSP طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی در محیط تمایزی استئوژنیک در محیط آزمایشگاهی، تغییری در الگوی متیلاسیون پروموتور ژن مذکور ایجاد نمی‌گردد (۱۷ و ۱۶).

تغییرات اپی ژنتیکی دیگر از طریق مولکول‌های miR نیز می‌توانند در تمایز استئوبلاستی ایفای نقش کنند. مطالعات مختلف حاکی از نقش افزایش بیان برخی از مولکول‌های miR در سرکوب بیان مولکول‌های آنتاگونیست مسیر سیگنالی Wnt و القای

اسید زولدرونیک می‌تواند سبب افزایش معنی‌دار بیان RUNX2 در هفته اول تمایز استئوبلاستی گردد (۱۲). در مطالعه‌ی دیگری نیز گزارش شده است که مسیر Wnt کانونیکال در افزایش تراکم بافت استخوان سالم و همچنین در درمان نقش اساسی دارد. در حقیقت موتاسیون‌هایی که به نقص در عملکرد رسپتور LRP5 منجر می‌شد، باعث بروز بیماری استئوپنیا یا نوع فامیلی استئوپروزیس می‌شود. این در حالی است که موتاسیونی که عملکرد این رسپتور را برمی‌گرداند، باعث افزایش تراکم استخوانی می‌شود. همچنین در موش‌هایی که فاقد یکی از آنتاگونیست‌های Wnt یعنی (Secreted Frizzled Related Protein 1 یا SFRP1) هستند، آپوپتوز سلول‌های استئوبلاست و استئوسیت کاهش می‌یابد، اما فعالیت استئوبلاست‌ها نظیر تکثیر و تمایز و تراکم تراکولار افزایش خواهد داشت (۱۳).

مطالعات بیشتر بر روی موش‌های ترانس ژن و Knockout برای مولکول‌های مسیر Wnt نظیر Dickkopf-2، SFRP-1، LRP-5/6 و اکسین و بتا کانتین مشخص کرد که مسیر کانونیکال در اکثر جنبه‌های فیزیولوژیکی استئوبلاست‌ها نظیر: تکثیر، تمایز و تشکیل ماتریکس استخوانی و آپوپتوز دخیل است (۱۴).

در سال ۲۰۰۹ گزارش شد که میانجی گره‌های مسیر Wnt که شامل SFRP-1,2 هستند، به طور اختصاصی در مغز استخوان بیان می‌شوند و با آزمایش‌های ایمونوسیتوشیمی مشخص گردید این عوامل در استئوبلاست‌ها بیان شده‌اند. بیان ژن SFRP1 در تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی تا ۲۹ برابر افزایش نشان می‌دهد (۱۵).

در مطالعه حاضر به بررسی نقش متیلاسیون پروموتور ژن APC در بیان این ژن طی تمایز استئوبلاستی پرداخته شد. نتایج به دست آمده حاکی

انطباق این وضعیت با هایپرمتیلاسیون پروموتور ژنی، اهمیت این نوع تغییرات اپی ژنتیکی در کنترل بیان ژنی مشخص می‌گردد. نتایج این مطالعه نشان‌دهندی وجود وضعیت هایپرمتیلاسیون در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی و همچنین در سلول‌های MSC می‌باشد. شناسایی مکانیسم‌های اپی ژنتیکی مؤثر در تغییر الگوی بیان فاکتورهای رونویسی استئوبلاستی و ژن‌های کلیدی دخیل در مسیرهای سیگنالی تمایز استئوبلاستی به ویژه مسیر سیگنالی Wnt کانونیکال می‌تواند به القای مؤثرتر تمایز استئوبلاستی به منظور استفاده از این سلول‌ها در سلول درمانی کمک کند. لذا پیشنهاد می‌گردد که مطالعات بعدی به بررسی عملکردی ژن APC در سطح پروتئین و در ارتباط با افزایش پایداری مولکول catenin- پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با کد ۲۱۲۲۲۴۵ می‌باشد. همچنین بدین وسیله از همکاری مسئولان پژوهشکده سلول‌های بنیادی و آزمایشگاه ژنتیک مولکولی بیمارستان تخصصی و فوق تخصصی صارم قدردانی و تشکر می‌نماییم.

تمایز استئوبلاستی می‌باشد. افزایش بیان miR-142-3p در خط سلولی مزانشیمی hFOB1 سبب کاهش بیان ژن APC و در نتیجه افزایش بیان ژن catenin- می‌گردد. به دنبال آن مسیر سیگنالی Wnt فعال شده و تمایز استئوبلاستی القا می‌گردد. همچنین مهار miR-142-3p به عنوان هدف مستقیم ژن APC سبب سرکوب تمایز استئوبلاستی خواهد شد (۹). در مطالعه‌ی دیگری نیز به نقش افزایش بیان miR-218 در سرکوب بیان ژن‌های Dickkopf2، Sclerostin (SOST)، و Secreted Frizzled-Related Protein2 (DKK2) به عنوان آنتاگونیست‌های مسیر سیگنالی Wnt که سبب تحریک تمایز استئوبلاستی می‌گردد، اشاره شده است (۱۸).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر حاکی از کاهش معنی‌دار بیان ژن APC در روز ۷ از تمایز استئوبلاستی می‌باشد؛ این در حالی است که کاهش بیان این ژن در روزهای ۱۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی معنی‌دار نبود ($P < 0/05$). بنابراین، به نظر می‌رسد نقش کاهش بیان این ژن در روز ۷ تمایز استئوبلاستی بتواند موجب پایداری بالای catenin- برای ورود به هسته جهت افزایش رونویسی گردد. در نتیجه با توجه به کاهش بیان ژن APC طی تمایز استئوبلاستی و

منابع

1. Mohammadi Y, Mirzadeh H, Moztarzadeh F, Soleimani M & Jabbari E. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on novel three-dimensional poly (L-lactic acid)/chitosan/gelatin/β-tricalcium phosphate hybrid scaffolds. Iranian Polymer Journal 2007; 16(1): 57-69.
2. Soleimani M & Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Nature Protocols 2009; 4(1): 102-6.

3. Dehghanifard A, Saki N, Ahmadvand M, Mahmoodinia Maymand M, Mosahebi Mohammadi M & Soleimani M. Mesenchymal stem cell; biology, application and role in regenerative medicine. Iranian Blood Transfusion Organization 2012; 8(4): 306-20[Article in Persian].
4. Beloti MM & Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. Brazilian Dental Journal 2005; 16(2): 156-61.
5. Yavropoulou MP & Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. Hormones (Athens) 2007; 6(4): 279-94.
6. Ling L, Nurcombe V & Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. Gene 2009; 433(1-2): 1-7.
7. Glass DA & Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. Endocrinology 2007; 148(6): 2630-4.
8. Miclea RL, van der Horst G, Robanus-Maandag EC, Löwik CW, Oostdijk W, Wit JM, et al. Apc bridges Wnt/ -catenin and BMP signaling during osteoblast differentiation of KS483 cells. Experimental Cell Research 2011; 317(10): 1411-21.
9. Hu W, Ye Y, Zhang W, Wang J, Chen A & Guo F. miR-142-3p promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. Molecular Medicine Reports 2013; 7(2): 689-93.
10. Boquest AC, Noer A, Sorensen AL, Vekterud K & Collas P. CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. Stem Cells 2007; 25(4): 852-61.
11. Klarmann GJ, Decker A & Farrar WL. Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. Epigenetics 2008; 3(2): 59-63.
12. Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S & Mahmoodinia Maymand M. Comparison of quantitative expression of Runx2 in mesenchymal stem cells (Mscs) differentiated by osteoblastic differentiation medium and Zoledronic Acid. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences 2012; 11(4): 377-90[Article in Persian].
13. Bodine PV, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H, McLarney S, Mangine A, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. Journal of Cellular Biochem 2005; 96(6): 1212-30.
14. Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Wieland M, Boyan BD & Schwartz Z. The roles of Wnt signaling modulators Dickkopf-1 (Dkk1) and Dickkopf-2 (Dkk2) and cell maturation state in osteogenesis on microstructured titanium surfaces. Biomaterials 2010; 31(8): 2015-24.
15. Nakajima H, Ito M, Morikawa Y, Komori T, Fukuchi Y, Shibata F, et al. Wnt modulators, SFRP-1, and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2009; 390(1): 65-70.
16. Tarfiei G, Noruzinia M, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M, Farshdousti Hagh M, et al. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. Cell Journal 2011; 13(1): 11-5.

17. Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S & Mahmodinia Maymand M. Zoledronic Acid induces osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without change in Hypomethylation status of OSTERIX promoter. Cell Journal 2012; 14(2): 90-7.

18. Hassan MQ, Maeda Y, Taipaleenmaki H, Zhang W, Jafferji M, Gordon JA, et al. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metabolic cancer cells. Journal of Biological Chemistry 2012; 287(50): 42084-92.

Evaluation Of APC Gene Expression And Methylation Pattern Following Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Differentiation Into Osteoblasts Category

Al-Huthaifi Raja¹ (MSc.) – Dehghanifard Ali² (MSc.) – Kaviani Saeid³ (Ph.D) – Noruzinia Mehrdad⁴ (Ph.D) – Rezaei Samira⁵ (MSc.) – Azad Mehdi⁶ (Ph.D) – Mashhadikhan Maedeh⁷ (Ph.D) - Solali Saeid⁸ (Ph.D)

1 Master of Science in Hematology, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 Ph.D Student in Laboratory Hematology & Blood Bank, Sarem Cell Research Center- SCRC, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

3 Associate Professor, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4 Associate Professor, Medical Genetics Department, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5 Master of Science in Genetics, Sarem Cell Research Center- SCRC, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

6 Assistant Professor, Medical Laboratory Sciences Department, School of Allied Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

7 Ph.D in Developmental Biology, Sarem Cell Research Center- SCRC, Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

8 Assistant Professor in Laboratory Hematology & Blood Bank, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Received : Nov 2015
Accepted : Feb 2016

Background and Aim: Different regulation processes have an effect on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), and among them Wnt signaling pathway is particularly desirable. In Wnt signaling pathway, Adenomatous Polyposis Coli (APC) bind to β -catenin and induce its degradation, thereby acting as a negative regulator of canonical Wnt pathway. In this study, gene expression and DNA methylation of APC gene during osteoblastic differentiation were determined.

Materials and Methods: In this experimental study, after the isolation of MSCs, the induction of osteoblastic differentiation was done. To confirm osteoblastic differentiation, alizarin red staining together with the expression of Alkaline Phosphatase (ALP) and osteocalcin as specific osteoblastic markers was performed. APC gene methylation status by MSP (Methylation Specific PCR) and gene expression status of APC gene using Real-Time PCR technique during different times were evaluated.

Results: The results of alizarin red staining and the expression of ALP and osteocalcin confirmed osteoblastic differentiation. In addition, the results showed a significant decrease in the expression of APC gene on the 7th day of osteoblastic differentiation ($P < 0.05$). Also, the results revealed hypermethylation status of APC gene promoter during osteoblastic differentiation.

Conclusion: It seems that the decreased expression APC gene will play an important role in Wnt signaling pathway regulation in different stages during osteoblastic differentiation of bone marrow-derived MSC. Also, according to the results, APC gene promoter methylation will play an important role in controlling gene expression.

Key words: Osteoblastic Differentiation, APC Gene, Methylation

* Corresponding Author:
Kaviani S
kavianis@modares.ac.ir