

بررسی پروتئوم هیپوکمپ به عنوان معیاری برای ارزیابی آلزایمر انسانی در موش بزرگ سفید آزمایشگاهی

- اسرا قمری^۱ (M.Sc.)، حکیمه زالی^{۲*} (Ph.D.)، مصطفی رضایی طاویرانی^۳ (Ph.D.)، سعید حسامی تکلو^۴ (Ph.D.)، فاطمه گشادرو^۵ (Ph.D.)، نایب‌علی احمدی^۳ (Ph.D.)، سارا ضمناهی^۶ (M.D.)، علی رشیدی پور^۷ (Ph.D.)
- ۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۲- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۳- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۴- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 - ۵- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۶- دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
 - ۷- مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلزایمر شایع‌ترین نوع دمانس است که مطالعه آن در انسان در مراحل اولیه بیماری امکان‌پذیر نیست و بیش‌تر مطالعات روی نمونه بافت مغز پس از مرگ انجام می‌شود. در نتیجه مطالعه مدل‌های حیوانی بیماری آلزایمر جهت شناسایی مکانیسم و فرآیندهای دخیل در آن جهت ارزیابی بیماری انسانی ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه با کمک دانش پروتئومیکس و بیوانفورماتیک به بررسی پروتئوم هیپوکمپ موش صحرایی پس‌از تزریق $A\beta(1-42)$ پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها: استخراج پروتئین از هیپوکمپ موش صحرایی سالم (N) و آلزایمری (A) که $A\beta(1-42)$ به آن‌ها تزریق شده بود، صورت گرفت و با استفاده از الکتروفورز دوبعدی جداسازی پروتئین‌ها انجام شد. ژل‌ها جهت رویت لکه‌های پروتئینی با کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد. پروتئین‌های دو گروه با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی آنالیز و توسط طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند.

یافته‌ها: آنالیز بیوانفورماتیکی ژل‌های به دست آمده از الکتروفورز دوبعدی نشان‌دهنده وجود ۱۱۱ پروتئین به صورت اختصاصی متعلق به گروه N و ۶۷ نقطه در گروه A با بیان جدید بود که ناشی از اثر تزریق است. تغییرات در سطح مولکولی با آنالیزهای آماری چندمتغیره‌ای نظیر کلاسترینگ انجام گرفت و گروه‌های پروتئینی دارای تغییر بیان، در دو خوشه متابولیکی و تنظیمی معرفی گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های شناسایی شده در هیپوکمپ موش آلزایمری دارای شرایط مشابهی در بیماری آلزایمر انسانی بودند. بنابراین با وجود تفاوت‌های موجود در بیماری در موش و انسان مطالعه بیماری آلزایمر در مدل موشی می‌تواند به ارزیابی بیماری در انسان پردازد. مطالعه اثر $A\beta(1-42)$ روی هیپوکمپ نیز بیانگر تغییرات در سطح پروتئین‌هایی بودند که با تغییرات کنفورماسیون پروتئینی موجود در این بیماری همراه بود و متابولیسم سلولی را نیز دچار تغییر کرده بود.

واژه‌های کلیدی: بیماری آلزایمر، پروتئومیکس، تحلیل خوشه‌ای، پپتید بتا آمیلوئید

آلزایمر شایع‌ترین نوع بیماری زوال عقل (دمانس) است،

مقدمه

مدل حیوانییک بیماری درواقع موجود زنده‌ای غیراز انسان است که درطول یک مطالعه با هدف درک یک بیماری ویا کشف روش‌های درمان آن استفاده‌می‌شود، تا کم‌ترین خطر و صدمه‌ای متوجه انسان نشود. حیواناتی که به‌این منظور مورد استفاده قرارمی‌گیرند، باید شباهت‌های ویژه‌ای با انسان داشته‌باشند تا در واکنش به‌بیماری و درمان، پاسخ‌های مشابه انسان را نشان دهند. به‌همین جهت مدل‌های مورد استفاده باتوجه به‌نوع مطالعه و نوع بیماری مورد بررسی، از میان حیوانات انتخاب می‌شوند [۱۱]. در واقع در بسیاری از مدل‌های حیوانی هدف اولیه، شبیه‌سازی یافته‌های نوروپاتولوژیکی در AD است [۱۲]. تزریق موادارویی و موادشیمیایی در مغز ویا القاء ضایعات در مناطق خاصی از مغز ممکن است برخی از ویژگی‌های AD را نشان دهد. بسیاری از مدل‌ها شامل تزریق پپتید $A\beta$ در مغز (غیر ترانسژنیک)، اختلال در سیستم کولینرژیک‌یا مداخلات ژنتیکی در ارتباط با بیان $A\beta$ (ترانسژنیک) می‌باشند [۱۳].

این کشف که $A\beta$ بخش اصلی پلاک‌های آمیلوئیدی (یکی از مشخصه‌های اصلی بیماری آلزایمر) است و برای سلول‌های عصبی، سمی می‌باشد؛ منجر به‌مطالعه *in vivo* و بررسی اثرات آن داخل مغز شد [۱۱]. حسینی و همکارانش در سال ۱۳۹۱ در بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک در ناحیه CA1 هیپوکمپ متعاقب تزریق $A\beta$ درمدل تجربی آلزایمر در موش صحرائی، مشاهده‌کردند که تزریق $A\beta(1-40)$ سبب کاهش قابل توجه شاخصه‌های رفتاری و کاهش تعداد نوروها در ناحیه CA1 در هیپوکمپ می‌گردد [۱۴]. Shi در بررسی تغییرات پروتئومیکی هیپوکمپ موش صحرائی به‌دنبال تزریق داخل هیپوکمپ $A\beta(1-40)$ ، پروتئین‌هایی را شناسایی کرد که نسبت به‌گروه کنترل دچار تغییر شده بودند. Synapsin Ib، پروتئین دی‌سولفات ایزومراز پیش‌ساز A3، زنجیره β توپولین، زیرواحد β ATP سنتاز با کاهش بیان نسبت‌به‌گروه کنترل در هیپوکامپ شناسایی شدند [۱۵].

یکی از میان‌برهای کشف هدف‌های دارویی، بهره‌گیری از دانش‌های جدید علوم‌پایه پزشکی نظیر ژنومیک،

که یک بیماری تحلیل برنده و پیش‌رونده قوای عقلانی سیستم عصبی مرکزی انسان به‌شمار می‌آید [۱]. امروزه بیماری آلزایمر (Alzheimer's Disease) به‌عنوان رایج‌ترین شکل بیماری زوال عقل شناخته‌می‌شود و ۲۴/۳ میلیون‌نفر در سراسر جهان به‌آن مبتلا هستند، که ۴۰٪ آن‌ها در کشورهای کم‌تر توسعه‌یافته زندگی می‌کنند [۲]. در ایران بیماری زوال عقل هنوز غربالگری نشده‌است. اما طبق جدول گروه ۱۰/۶۶ شاخه علمی انجمن آلزایمر که در مجله لانست به‌چاپ رسیده‌است، جمعیت مبتلا به بیماری زوال عقل در ایران حدود ۲۵۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰۰ نفر تخمین زده‌می‌شود [۳]. از نظر هیستوپاتولوژی، AD با تجمع داخل سلولی کلافه‌های نوروفیبریلاری و پلاک‌های پیری (پلاک‌های آمیلوئیدی) خارج سلولی در مناطق خاص از مغز، به‌همراه دژنراسیون‌های سیناپسی مشخص می‌گردد [۴].

آمیلوئید در واقع اصطلاح عمومی است که به‌تجمعات منظم پروتئینی گفته‌می‌شود و دارای خواص ویژه‌ای مانند اتصال به‌رنگ‌دانه قرمز کنگو و تیوفلاوین T، مقاومت بالا در برابر تجزیه پروتئازی و ظهور رشته‌ای در زیر میکروسکوپ الکترونی می‌باشد [۵]. برش‌های متوالی در پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید (Amyloid Precursor Protein) توسط دو آنزیم β و γ سکرکراز ایجاد می‌گردد، که منجر به‌تولید آمیلوئید بتا (Amyloid Beta) با دو C ترمینال متفاوت در جایگاه‌های $A\beta(1-40)$ و $A\beta(1-42)$ می‌گردد [۶]. پردازش تغییر یافته‌ی پروتئین آمیلوئید از APP از عوامل اصلی پاتوژنز بیماری در نظر گرفته می‌شود [۷]. پروتئین تاو، فسفو پروتئینی است که عضوی از خانواده پروتئین وابسته به‌میکروتوبول بوده و با عمل فسفریلاسیون پایداری آن‌ها را تنظیم می‌کند [۸]. کلافه‌های نوروفیبریلاری مهم‌ترین جزء میکروتوبول‌های پروتئین تاو می‌باشند، که وجود آن‌ها در کورتکس و هیپوکمپیکی از نشانه‌های بارز AD است [۹]. به‌نظر می‌رسد در AD به‌دلیل زوال عمل کردی تاو، میکروتوبول‌ها در نوروهای فرد مبتلا، به‌تدریج توسط کلافه‌ها جایگزین می‌گردند [۱۰].

میلی مولار ۶ بنز آمید، ۱۲/۵ میلی مولار ۶-آمینوکاپروئیکاسید) است. سلول‌ها در درجه حرارت پایین به کمک دستگاه هموژنیزر همگون گردید. مخلوط هموژنیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جهت تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین‌های دو گروه به روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت [۱۶].

الکتروفورز دوبعدی. در بعد اول، IEF (Iso Electric Focusing) از نوارهای زلی (IPG (Imobilized pH Gradient) در رنج 3 pH تا ۱۰ استفاده شد و پروتئین‌ها درون دستگاه IPG بسته به pH ایزوالکتریک خود روی استریپ تفکیک شدند. بعد دوم شامل ژل پلی‌اکریل آمید با غلظت ۱۲٪ حاوی ۱۵ میلی از محلول ذخیره ۳۰٪ (اکریل آمید به علاوه بیس‌اکریل آمید با نسبت ۲/۲۹ درصد به ۸/۰٪)، ۱۸/۷۶ میلی لیتر آب دی‌یونیزه و ۱۱/۲۵ میلی لیتر بافر تریس و هم‌راه ۳۰ میکرولیتر TEMED و ۳۰ میکرولیتر آمینیوم پرسولفات است. بافر الکتروفورز (Running Buffer) به تانک‌های بالا و پایین افزوده شد. این بافر شامل ۰/۰۲۵ مولار تریس‌اسید کلریدریک (یا باز)، ۰/۱۹۲ مولار گلیسین و ۰/۱٪ SDS می‌باشد. در نهایت پس از برقراری جریان ثابت ۳۰ الی ۴۰ میلی آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک‌کننده در دمای ۹ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. رنگ آمیزی پروتئین‌ها به روش کوماسی بلو کلونیدی انجام شد و ژل‌ها اسکن و تصاویر پردازش شد و در نهایت با روش‌های بیوانفورماتیکی و نرم‌افزارهای آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت [۱۶].

آنالیز تصویر ژل‌های دوبعدی. الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی‌پپتید را براساس بار الکتریکی و وزن مولکولی آن‌ها جدا کند. پس از طی مراحل رنگ آمیزی، پروتئین‌ها به صورت لکه‌هایی با صفات و ویژگی‌های ظاهری متفاوت مانند شکل، اندازه و شدت رنگ نمایان می‌گردند. پس از اسکن ژل، استخراج داده‌های مربوط به نمونه بافت هیپوکامپ موش‌های

پروتئومیک، متابولومیک و بیوانفورماتیک می‌باشد، که به صورت جامع‌نگر به مطالعه مباحث بیولوژیک می‌پردازد. در این مطالعه با کمک دانش پروتئومیک و استفاده از آمار زیستی و بیوانفورماتیک به بررسی پروتئوم هیپوکمپ موش صحرایی پس از تزریق $\beta(1-42)$ پرداخته شده است. پروتئوم مغز موش‌های آزایمیری و سالم تحت آنالیز شبکه قرار گرفتند [۱۶].

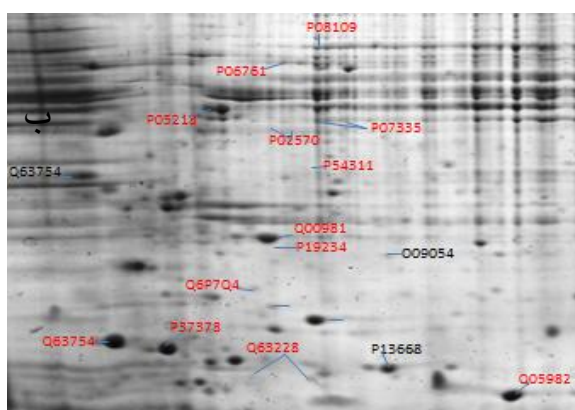
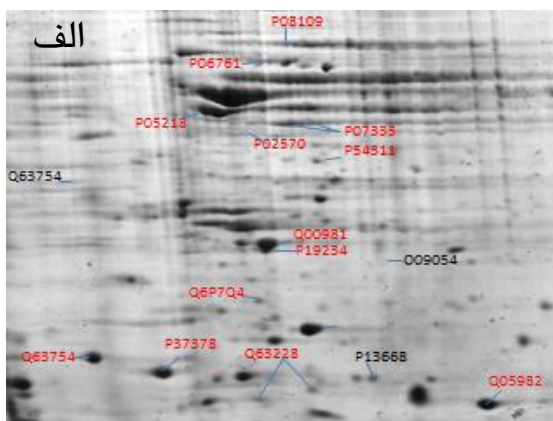
مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر بالغ ۲۸۰-۲۲۰ گرمی به صورت تصادفی انتخاب شد و در بین دو گروه آزمایشی شامل موش‌های سالم (C) به عنوان گروه کنترل و موش‌های آزایمیری (A) مورد مقایسه قرار گرفتند. حیوانات گروه کنترل آب مقطر را از طریق جراحی دریافت نمودند [۱۶]. تمام موارد اخلاقی از جمله پرورش صحیح حیوان (شامل آب و غذای کافی، درجه حرارت مطلوب و ...) رعایت شد.

جهت القاء آزایمر در حیوانات، از طریق ۱۰ میکروگرم آمیلوئید بتا به صورت محلول در ۲ میکرولیتر آب مقطر درون بطن مغز استفاده شد. بدین صورت که پس از انجام جراحی و ایجاد سوراخ روی جمجمه توسط مته مخصوص، به وسیله سرنگ همپلتون آمیلوئید بتا درون بطن مغز تزریق شد و پس از مسدود کردن سوراخ، به وسیله نخ بخیه جذبی بخیه شد. بعد از ۲۲ روز، جهت اطمینان از تشکیل پلاک، مغز حیوان خارج شد. مراحل فیکس کردن، تهیه برش و رنگ آمیزی مخصوص پلاک انجام شد و زیر میکروسکوپ مشاهده شد که پلاک آمیلوئیدی تشکیل شده باشد (تأیید بافتی) [۱۶].

استخراج پروتئین از نمونه هیپوکامپ موش‌های هردو گروه صورت گرفت و دوبار با PBS شستشو داده شد. سپس به آن‌ها بافر سرد تریس ۲۰ میلی مولار با $\text{pH}=7.5$ اضافه شد. این بافر حاوی ۲ میلی مولار اتیلن دی‌آمین تترااستات ۱، ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۲، ۰/۳۲ مولار سوکروز به هم‌راه مخلوطی از آنتی‌پروتئازها شامل (۱۰ میلی مولار N-اتیل مالامید، ۲ میلی مولار یدواستات، ۲۵

آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین پروتئین‌های استخراج شده از هیپوکمپ موش آزایمیری با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape3 رسم شد. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در شکل ۲ نشان داده شده است که این شبکه شامل ۵ گروه است. در جدول ۲ آنالیز شبکه و تعیین hub‌های شبکه مشخص شده است. در شکل ۳ آنالیز ClusterOne نیز به تصویر کشیده شده، که کمپلکس‌های پروتئینی که با هم در یک شبکه برهمکنش پروتئینی تداخل دارند را می‌یابد. آنالیز GO پروتئوم به دست آمده از مقایسه دو گروه آزمایشی با استفاده از ClueGO-Cluepedia در شکل ۴ نشان داده شد که شامل دو گروه از فرآیندهای بیولوژیک بوده که گروه ۱ دربرگیرنده فعالیت‌های متابولیک است و گروه ۲ شامل فرآیندهای تنظیمی سلولی می‌باشد.



شکل ۱ ژل الکتروفورز دو بعدی از پروتئین‌ها که بر روی ژل‌های مختلف (الف، ب) نشان داده شده است که به ترتیب مربوط به گروه‌های A و N است. پروتئین‌های مشخص شده با رنگ قرمز پروتئین‌های با افزایش بیان در N نسبت به A هستند و پروتئین‌های مشخص شده با رنگ سیاه افزایش بیان در A نسبت به N دارند. جداسازی در ژل‌ها بر اساس ۳PI-۱۰ انجام شده است.

دو گروه با نرم‌افزار Non Linear Progenesis Same Spot مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی پروتئین‌ها با طیف سنجی جرمی. پس از آنالیز ژل‌ها، پروتئین‌هایی که بیان آن‌ها بیش از دو برابر تغییر نموده است جهت شناسایی با طیف سنجی جرمی انتخاب شدند. این پروتئین‌ها از ژل با روش دستی جدا شده و برای انجام طیف سنجی جرمی با MALDI-TOF/TOF به خارج از ایران فرستاده شدند. جهت شناسایی پروتئین‌ها از موتور جستجوی Mascot (Version 2.2, Matrix Science, London, UK) و پایگاه داده Uniprot استفاده شد. شناسایی پروتئین‌ها عموماً با شناسایی دو پپتید یا بیش‌تر از پروتئین مربوطه که نمرات یونی آن‌ها از آستانه آماری ($p < 0.05$) پیشی گرفته باشد انجام شد. روش‌های تجزیه و تحلیل داده‌ها. داده‌های حاصل از تکنیک ژل الکتروفورز دوبعدی با آمار چندمتغیره مورد آنالیز قرار گرفت و برای مقایسه بیان پروتئین‌ها در دو گروه از روش‌های آماری t-test استفاده شد. هم‌چنین از نرم‌افزارهای Cytoscape برای رسم شبکه و نرم‌افزارهای ClueGO-Cluepedia و ClusterONE برای آنالیز شبکه استفاده شد.

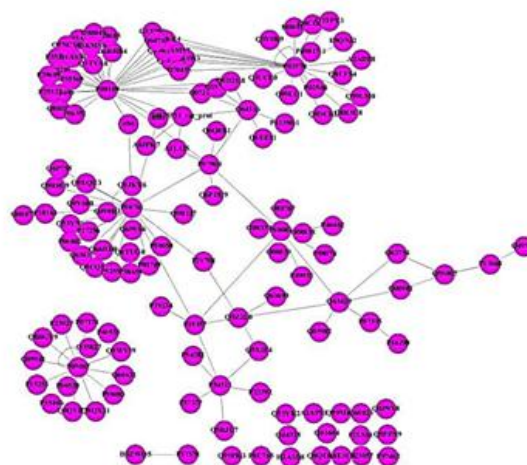
نتایج

SDS-PAGE پروتئین‌های هیپوکامپ موش صحرائی. تغییرات بیان پروتئین‌ها در اثر تزریق $A\beta(1-42)$ در هیپوکامپ موش صحرائی با کمک تکنیک پروتئومیکس مورد بررسی قرار گرفت و با پروتئوم هیپوکامپ موش کنترل مقایسه شد. دو گروه آزمایشی شامل موش‌های سالم (N) و موش‌های آزایمیری (A) مورد مقایسه قرار گرفتند. در شکل ۱، تصویر ژل الکتروفورز دوبعدی از هیپوکامپ موش صحرائی N و A را نشان می‌دهد. ۱۱۱ پروتئین به‌طور اختصاصی متعلق به گروه کنترل است که در آزایمیری بیان نشده و ۶۷ پروتئین نیز دارای بیان جدید در حالت آزایمیری هستند. در جدول ۱ پروتئین‌های شناسایی شده توسط طیف سنجی جرمی در هیپوکامپ موش آزایمیری را نشان می‌دهد.

جدول ۱. پروتئین های بیان شده در هیپوکمپ موش به دست آمده از طیف سنجی جرمی. در این جدول علاوه بر وزن مولکولی (MW) و pH و الکتریک (pI) پروتئین ها، به جستجوی پروتئین های شناسایی شده در مطالعات قبلی پرداخته شده و تغییرات رخ داده در پروتئین ها همراه را منبع آن در ستون آخر جدول گنجانده شده است.

ID	Accession No. Swiss-Prot	Protein name	Gene name	Full name	MW	PI	Anova (p)	Protein abundance ratio	Comments	References
N>AB										
1	P08109	HSP7C RAT	HSPA8	Similar to Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	71055	5.3	7.73E-09	1.8	Downregulation in HP	[17]
2	P07335	KCRB RAT	CKB	Creatine kinase, b chain (EC 2.7.3.2) (b-ck)	42970	5.4	1.35E-08	8.2	Decreased in HP	[18]
3	Q6P7Q4	LGUL_RAT	Glo1	Lactoylglytathionylase	20803	5.2	2.65E-08	2.7	Downregulation in HP	[19]
4	P37378	SYU1 RAT	SncA	Alpha-synuclein, forms 1 and 3	14506	4.6	4.64E-08	2.1	Increased in Limbic Area	[20]
5	P02570	ACTB RAT	ACTB	Actin, cytoplasmic 1 (beta-actin)	42051	5.2	6.48E-08	2.8	Downregulation in HP	[19]
6	P19234	NUHMRAT	Ndufv2	NADH-ubiquinone dehydrogenase 24 kDa subunit (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (fragment)	26853	6.4	8.91E-08	6.5	Decreased in AD brain	[21]
7	Q63754	SYUB RAT	SNCB	Beta-synuclein (phosphoneuroprotein 14)	14495	4.3	2.55E-07	1.6	Decreased in temporal cortex	[22]
8	Q00981	UBL1 RAT	Uchl1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme II	27,525	5	3.82E-07	2.4	Decreased in HP	[23]
9	P54311	GBB1 RAT	GNB1, GNB4	Guanine nucleotide-binding protein b subunit	38167	5.6	4.05E-07	2.8	Upregulate in HP	[18]
10	P05218	TBB5-RAT	Tubb5	Tubulin b-5 chain	50095	4.6	1.90E-06	2.4	Downregulate in HP	[18]
11	Q05982	NDKA RAT	Nme1	Nucleoside diphosphate kinase a	17295	6.3	2.82E-06	1.4	Decreased in frontal, occipital, parietal	[24]
12	Q63228	GLMB RAT	Gmfb	Glia maturation factor b (GMF-b)	16765	5.2	3.48E-05	1.6	GMF increased in HP	[25]
13	P06761	GR78 RAT	HSPA5	78 kDa glucose regulated protein (immunoglobulin heavy chain binding protein) heat shock protein 5	72473	4.9	1.70E-07	2.5	Increased susceptibility in AD brain	[26]
N<AB										
14	P13668	STHMRAT	Stmn1	Stathmin (phosphoprotein p19)	17,288		5.65E-06	1.7	Decreased in neocortex	[27]
15	O09054	APOA1_RAT	APOA1	Apolipoprotein A-I	30,062	5.9	0.001	1.6	Without any alteration in HP	[28]
16	P08081	CLCA_RAT	Clta	Clathrin light chain a (brain and lymphocyte lca)	27078	4.2	3.12E-07	6	Involved in AD	[29]

Ckb پروتئین های سیتوپلاسمی معرفی شدند. آنالیز GO شبکه از لحاظ عمل کرد مولکولی پروتئین های Stmn1, Gnb1, Sncb, CKb, Hspa5, Uchl1, Vdac1, Nme1, Gmfb استفاده از نرم افزار ClueGO-Cluepedia در شکل ۶ نمایش داده شده است.

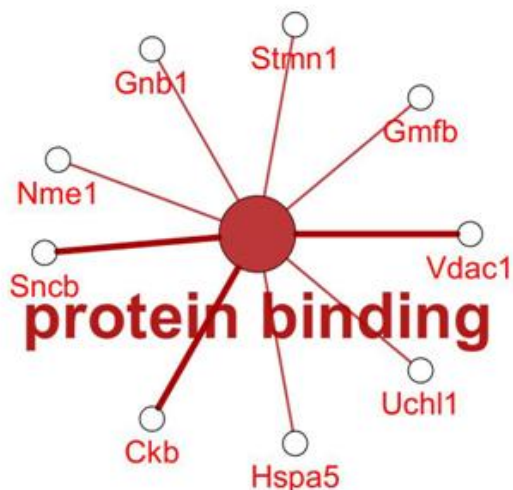


جدول ۲ آنالیز شبکه و تعیین پروتئین های HUB در شبکه با استفاده از نرم افزار Cytoscape را نشان می دهد که پروتئین هایی هستند که بیشترین برهمکنش را دارند

protein name	Degree
Q5S007	3
34875531_rat_prot	4
P19357	5
P54311	6
Q63429	6
P97900	7
Q64316	7
P08081	10
P08081	10
P05067	16
P02570	24
P06761	27
P08109	31

شکل ۲. شبکه اینترکشن پروتئین پروتئین از پروتئین های بیان شده در هیپوکمپ موش پس از تزریق $A\beta(1-42)$ که توسط نرم افزار Cytoscape رسم شده است.

آنالیز خوشه بندی شبکه بر اساس دسته بندی GO از نظر بخش های سلولی با استفاده از ClueGO-Cluepedia در شکل ۵ نمایش داده شده است، که پروتئین های Clta, Sncb, Vdac1, Ndufv2, Nme1, Stmn1, Uchl1, Hspa5 و

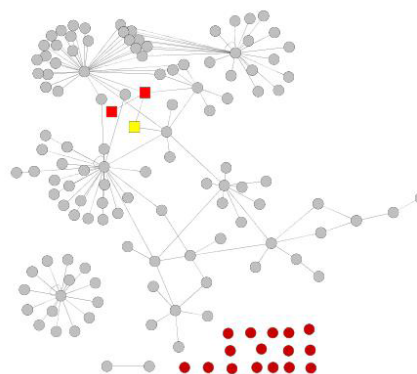


شکل ۶ آنالیز خوشه بندی شبکه بر اساس دسته بندی GO که با نرم افزار ClueGo-Cluepedia رسم شده است و عملکرد مولکولی پروتئین های شناسایی شده را نشان می دهد.

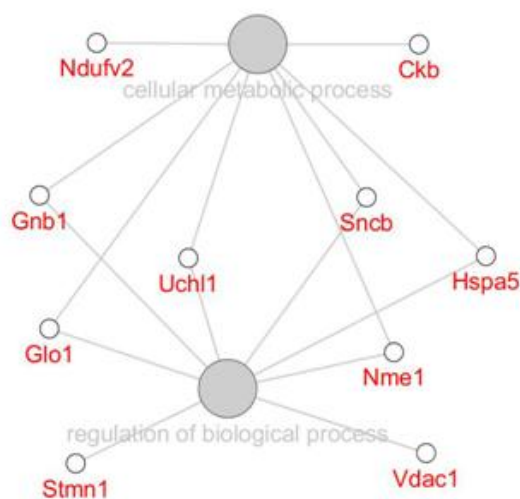
بحث و نتیجه گیری

هدف از تحقیقات پیرامون بیماری آلزایمر، شناسایی فرآیندهای دخیل در بیماری و کشف هدف های دارویی است. اگرچه مکانیسم دقیق بیماری آلزایمر هنوز مشخص نشده است، اما محققان با بررسی ژنومیک، پروتئومیک و متابولومیک سعی در شناخت این بیماری دارند. بیماری آلزایمر یک بیماری چند عاملی است که جهش های ژنتیکی و عوامل محیطی در بروز آن نقش دارند. در این پژوهش به ارزیابی مکانیسم اثر $A\beta(1-42)$ در هیپوکامپ موش صحرایی با استفاده از تکنیک های پروتئومیکس پرداخته شد. شکل ۱ زل الکتروفورز دو بعدی در دو گروه سالم و آلزایمری را نشان می دهد که شامل پروتئین های بیان شده در دو گروه است. مطابق جدول ۱ پروتئین های شناسایی شده در هیپوکامپ موش مورد جستجوی متون علمی قرار گرفت تا اشتراکات با بیماری آلزایمر انسانی مشخص گردد و مطابق جدول ۱ بیش تر پروتئین های مشخص شده در موش دارای شرایط یکسانی با بیماری آلزایمر انسانی هستند و این می تواند بیانگر این باشد که با وجود پیچیدگی بیماری آلزایمر انسانی جهت مطالعه آن می توان از تحقیقات مبتنی بر مدل های حیوانی استفاده نمود.

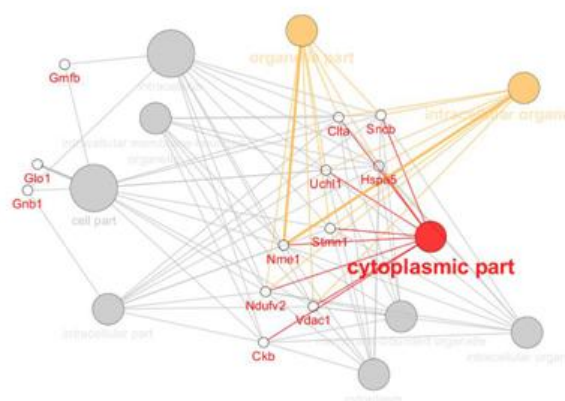
آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین بیماری آلزایمر (شکل ۲) شامل روش های آماری است که یکی از اهداف آن



شکل ۳. آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین با clusterone که حضور Hub ها را تأیید می کند.



شکل ۴. آنالیز خوشه بندی شبکه بر اساس دسته بندی GO (فرآیندهای بیولوژیک) با نرم افزار ClueGo-Cluepedia که نشان دهنده ی گروه بندی پروتئین ها در دو گروه متابولیکی و تنظیمی در فرآیندهای سلولی است.



شکل ۵. آنالیز خوشه بندی شبکه بر اساس دسته بندی GO (بخش های سلولی) که با نرم افزار ClueGo-Cluepedia رسم شده و نشان دهنده دسته بندی پروتئین ها در بخش های سلولی است

هیپوکامپ موش آلزایمری در قسمت‌های مختلف سلولی از جمله سیتوپلاسم و اندامک‌های داخل سلولی قرار دارند (شکل ۴). هم‌چنین آنالیز خوشه‌بندی شبکه براساس دسته‌بندی GO از لحاظ عمل‌کرد مولکولی، نشان‌دهنده عمل‌کرد پروتئین‌های *Uchl1*, *Hspa5*, *Ckb*, *Sncb*, *Vdac1*, *Gmfb*, *Stmn1*, *Gnb1* و *Nme1* در اتصالات پروتئینی است (شکل ۶).

فرآیندهای تنظیمی بیولوژیکی، ارتباط تنگاتنگی با فرآیندهای متابولیکی دارند. در هر فرآیند متابولیکی پروتئین‌هایی حضور دارند، که پیشرفت فرآیند را کنترل می‌کنند. اختلال در تنظیم چنین پروتئین‌هایی می‌تواند روی کل فرآیندهای متابولیکی تأثیرگذار بوده و فرآیند مورد نظر را مهار و یا افزایش دهند [۳۲].

یکی از Hub های شبکه، پروتئین APP است. این پروتئین پیش‌ساز پپتید $A\beta$ است که تغییرات پروتئوم در هیپوکمپ موش آلزایمری نیز به واسطه حضور این پروتئین است و در شبکه برهمکنش پروتئین نیز یکی از پروتئین‌های مهم است. پاتولوژی AD توسط رسوب آمیلوئید در سیستم عصبی مرکزی به صورت پلاک‌های نوریتیک و در ساختار عروق مغزی مشخص می‌شود. پژوهش‌های زیادی روی تعیین مکانیسم‌های سمیت ناشی از $A\beta$ تمرکز کرده‌اند. یکی از زمینه‌های اصلی در اطراف محور نوروتوکسیسیته به واسطه کلسیم است [۳۳]. $A\beta$ یک تنظیم‌کننده سیناپسی است که به‌عنوان اندوسیتوز رستورهای NMDA و AMPA و یا مهار LTP حضور دارد. در شرایط پاتولوژیکی، سیناپس‌ها مورد هدف $A\beta$ قرار می‌گیرند، که نتیجه آن اختلال در انتقالدهنده عصبی گلوتامات و LTP از بازیافت و زیکول‌های پیش‌سیناپسی و دژنراسیون نوریتیک خواهد بود [۳۴]. پپتیدهای $A\beta$ می‌تواند باعث (۱) افزایش جریان کلسیم از طریق کانال‌های کلسیمی و درجه‌دار وابسته به ولتاژ (کانال‌های نوع N و L) شود، (۲) کاهش انسداد گیرنده‌های NMDA ناشی از منیزیم شود و اجازه افزایش جریان کلسیم دهد و (۳) تشکیل کانال یونی انتخابی کاتیونی بعد از تلفیق پپتیدهای $A\beta$ با غشای سلولی دهد.

شناسایی پروتئین‌هایی با بیش‌ترین برهمکنش است که به قطب‌های شبکه (Hub) معروفند. ژن‌های Hub به‌دلیل اهمیتشان در ساختار کلی شبکه، در بسیاری از شبکه‌های بیولوژی دارای گرایش افزایش یافته به حضور دارند و دارای ارتولوگ در انواع ارگانسیم‌ها هستند. بنابراین، این گره‌ها در طی تکامل خیلی حفاظت شده هستند و در بیماری‌های پیچیده نیز به عنوان یک شاخص دیده می‌شوند [۳۰]. جدول ۲ پروتئین‌های Hub در شبکه را نشان می‌دهد. شبکه برهمکنش از پروتئین‌های بیان شده در هیپوکامپ موش توسط نرم‌افزار Cytoscape نشان می‌دهد که *HSPA5*, *APP*, *HSPA8* و *ACTB* پروتئین‌های Hub هستند. با توجه به تعاملات زیاد این پروتئین‌ها، اختلال در بیان و یا عمل‌کرد آن‌ها تغییر آشناری زیادی روی پروتئین‌های دیگر دارد. آنالیز شبکه اینتراکشن پروتئین-پروتئین با Clusterone نیز این مسئله را تأیید می‌کند (شکل ۳).

به‌دلیل طبیعت مدولار شبکه‌های سلولی، امروزه استفاده از مدل‌های ژنی برای تعیین عمل‌کرد ژنی به‌طور وسیعی مورد توجه قرار گرفته است. زیرشبکه‌های شناسایی شده در شبکه‌ها اغلب جهت تشخیص ژن‌ها به یک عمل‌کرد بیولوژیکی مفروض، مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌این‌منظور اغلب پایگاه داده انتولوژی کنترل شده‌ای مانند *GO*, *KEGG* و *MAPP* Gene مورد استفاده قرار می‌گیرد. نرم‌افزار *ClueGo-Cluepedia* پروتئوم را مورد آنالیز انتولوژی با پایگاه داده *GO* و *KEGG* قرار می‌دهد [۳۱]. آنالیز خوشه‌بندی شبکه براساس دسته‌بندی GO از لحاظ فرآیندهای بیولوژیکی نشان می‌دهد، که *Ckb*, *Ndufv2* در فرآیندهای متابولیک سلولی نقش دارند. هم‌چنین *Vdac1* و *Stmn1* پروتئین‌هایی با نقش تنظیمی در فرآیندهای بیولوژیکی هستند. *Uchl1*, *Sncb*, *Hspa5*, *Glo1*, *Nme1* و *Gnb1* نیز پروتئین‌هایی هستند که در هر دو فرآیند بیولوژیکی شرکت دارند (شکل ۴).

آنالیز خوشه‌بندی شبکه براساس دسته‌بندی GO از لحاظ بخش‌های سلولی نشان می‌دهد که پروتئین‌های بیان‌شده در

منجر به این فرض شد، این مناطق که در بیماری آرایمر به شدت آسیب پذیر هستند به دلیل بیان پایین پروتئین شوک حرارتی Hsc70 می باشد. Hsc70 کربونیل شده در بسیاری از بیماری های نورودژنراتیو مشاهده شده است. Hsc70 کربونیل شده، عدم فعال شدن پروتئین برای ایجاد عمل کرد مناسب را در پی دارد و پروتئین را به سمت تجمع با $\text{A}\beta$ و ایجاد استرس اکسیداتیو سوق می دهد [۴۰].

Actb نیز پروتئین Hub است که به عنوان یک پروتئین داخل سلولی عمل می کند. بتاکتین (Actb) یکی از دو ایزوفرم خانواده اکتین است، که در سلول های غیر ماهیچه ای حضور دارد. میزان بیان این پروتئین در مغز افراد مسن کم تر از افراد جوان است. بتاکتین در آکسون های نابالغ در حال رشد، بیان بالایی دارد. این پروتئین هم چنین در سلول های گلیال نیز مشاهده شده است [۴۱]. یک پارچگی شبکه اسکلت سلولی در حفظ فعالیت های سلول بسیار مهم است و Actb در حفظ آن نقش دارد. علاوه بر رسوب آمیلوئید، ناهنجاری های اسکلت سلولی نیز یک ویژگی ثابت در AD است [۴۲]. اختلال در فعالیت های اسکلت سلولی به عنوان نتیجه نیتراسیون و اکسیداسیون Actb در سلول منجر به مرگ سلولی می شود [۱۹]. هر چند مطالعات مدل های حیوانی یک بیماری مطابقت کاملی با نوع انسانی آن ندارد، اما می توان گفت که مدل های ساده حیوانی یک بیماری می تواند برخی از ویژگی ها و نشانه های بیماری را به منظور بررسی آن بیماری و با توجه به هدف پژوهش ایجاد کند. نتایج این مطالعه نشان داد که در سطح بیان برخی پروتئین ها، تغییرات بیان مشابه در موش و انسان در این بیماری مشاهده می شود و نتایج آنالیز بر اساس شبکه نیز بیانگر حضور پروتئین هایی در شبکه است با بیش ترین برهمکنش با پروتئین های دیگر که می توانند به عنوان Hub معرفی گردند. هم چنین این پروتئین ها با تغییرات کنفورماسیون پروتئینی، برهمکنش و اتصالات پروتئینی و اسکلت سلولی همراه هستند. از طرفی تغییر در سطح بیان این پروتئین ها با توجه به نقش آن ها در مسیرهای تنظیمی و

کانال های کاتیونی به وسیله پپتیدهای $\text{A}\beta$ محلول القاء می شوند. بنابراین پپتیدهای $\text{A}\beta$ می تواند حتی قبل از تشکیل فیبریل هم سمی باشند. شواهد نشان می دهد که مس و روی ساختار پپتیدهای $\text{A}\beta$ را می تواند تعدیل کند تا هم تشکیل منافذشان و هم رسوبشان را اجازه دهد [۳۳]. سمیت $\text{A}\beta$ ، افزایش اکسایتوتوکسیسیتی از طریق تولید سیگنال های مهاری، القاء پاسخ های التهابی و تشکیل رادیکال آزاد است. پپتیدهای $\text{A}\beta$ سایتوکاین های پیش التهابی را القاء می کند که آبخار التهابی را شروع می کند و سبب مرگ سلولی می شود. تولید گونه های فعال اکسیژن از جمله اکسید نیتریک به وسیله چندین فاکتور شامل کلسیم، آبخارهای التهابی و فرآیند میتوکندریائی تنظیم می شود [۳۵]. با توجه به برهمکنش زیاد این پروتئین با پروتئین های دیگر، تولید نابجای این پروتئین می تواند سبب اختلال در مسیرهای مختلف سلولی گردد.

HSPA8 و HSPA5 نیز دو Hub هستند که به عنوان پروتئین های چارونی عمل می کنند. آرایمر با تاخوردگی ناصحیح و کاهش حجمی پروتئین همراه است. این پدیده می تواند با اختلال در تنظیم پروتئین های چارون از جمله HSPA8، Hsp7c و Hspa5 که دچار کاهش بیان هستند، ارتباط داشته باشد [۳۶]. این پروتئین ها در همه اجزاء مهم سلولی نظیر سیتوزول، میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی حضور دارند. در زمان فقدان استرس، پروتئین های شوک حرارتی، حدود ۱٪ از کل پروتئین های سلولی و در زمان بروز استرس حدود ۲۰٪ کل پروتئین ها را شامل می شوند [۳۷]. واضح است که کاهش بیان این پروتئین ها سبب پیچ خوردگی ناصحیح پروتئین ها و در نهایت تجمع آن ها در سلول می شود. افزایش بیان این پروتئین ها در مدل های حیوانی از تجمع پروتئین ها جلوگیری کرده، در نتیجه این پروتئین ها به عنوان یکی از اهداف درمانی مورد توجه محققان قرار گرفته اند [۳۸]. مطالعات اخیر نشان دهنده افزایش بیان HSPA5 (HSP78) در کورتکس و هیپوکامپ افراد مبتلا به AD است [۳۹]. قشر انتوریال و هیپوکامپ در لوب تمپورال، کاهش سطح Hsc70 (HspA8) در افراد مبتلا به AD را نشان می دهد. این یافته ها

of alzheimer's disease. *J Babol Unive Med Sci* 2012; 14: 90-96.

[15] Shi X, Lu X, Zhan L, Liu L, Sun M, Gong X, et al. Rat hippocampal proteomic alterations following intrahippocampal injection of amyloid beta peptide (1-40). *Neurosci Lett* 2011; 500: 87-91.

[16] Zali H, Rezaei Tavarani M, Pakzad I. Proteomic study of rat hippocampus in aqua extract treatment of lavandula aqua extract. *J Ilam Univ Med Sci* 2013; 20: 22-31. (Persian).

[17] Silva PN, Furuya TK, Braga IL, Rasmussen LT, Labio RW, Bertolucci PH, et al. Analysis of HSPA8 and HSPA9 mRNA expression and promoter methylation in the brain and blood of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimer's Dis* 2014; 38: 165-170.

[18] Xu PT, Li YJ, Qin XJ, Scherzer CR, Xu H, Schmechel DE, et al. Differences in apolipoprotein E3/3 and E4/4 allele-specific gene expression in hippocampus in Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 256-275.

[19] Zahid S, Oellerich M, Asif AR, Ahmed N. Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochem Res* 2014; 39: 208-215.

[20] Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 492-501.

[21] Liu HY, Liao PC, Chuang KT, Kao MC. Mitochondrial targeting of human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 (NDUFV2) and its association with early-onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *J Biomed Sci* 2011; 18: 1-17.

[22] Rockenstein E, Hansen LA, Mallory M, Trojanowski JQ, Galasko D, Masliah E. Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease. *Brain Res* 2001; 914: 48-56.

[23] Mizukami K, Abrahamson EE, Mi Z, Ishikawa M, Watanabe K, Kinoshita S, et al. Immunohistochemical analysis of ubiquilin-1 in the human hippocampus: Association with neurofibrillary tangle pathology. *Neuropathology* 2014; 34: 11-18.

[24] Kim SH, Fountoulakis M, Cairns NJ, Lubec G. Human brain nucleoside diphosphate kinase activity is decreased in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 970-975.

[25] Stolmeier D, Thangavel R, Anantharam P, Khan MM, Kempuraj D, Zaheer A. Glia maturation factor expression in hippocampus of human Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2013; 38: 1580-1589.

[26] Hsu WC, Wang HK, Lee LC, Fung HC, Lin JC, Hsu HP, et al. Promoter polymorphisms modulating HSPA5 expression may increase susceptibility to Taiwanese Alzheimer's disease. *J Neural Trans* 2008; 115: 1537-1543.

[27] Jin LW, Masliah E, Iimoto D, Deteresa R, Mallory M, Sundsmo M, et al. Neurofibrillary tangle-associated alteration of stathmin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1996; 17: 331-341.

[28] Shibata N, Nagata T, Shinagawa S, Ohnuma T, Shimazaki H, Komatsu M, et al. Genetic association between APOA1 and APOD polymorphisms and Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Neural Transm* 2013; 120: 1599-1603.

[29] Nakamura Y, Takeda M, Yoshimi K, Hattori H, Hariguchi S, Kitajima S, Hashimoto S, Nishimura T. Involvement of clathrin light chains in the pathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1994; 87: 23-31.

[30] Butterfield DA, Poon HF, St Clair D, Keller JN, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins

متابولیکی، می تواند تغییرات شدید سلولی را در پی داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی - ملکولی خانم اسرا قمری است. از حمایت های مالی مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قدردانی می گردد.

منابع

[1] Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis mon* 2010; 56: 484-546.

[2] Barrow CJ, Small DH. *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*: Springer; 2007.

[3] Kidd PM. Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev* 2008; 13: 85.

[4] Association As. 2008 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 2008; 4: 110.

[5] Butterfield DA, Reed T, Newman SF, Sultana R. Roles of amyloid β -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 658-677.

[6] Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Review article: genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 2010; 23: 213-227.

[7] Picq JL. Aging affects executive functions and memory in mouse lemur primates. *Exp Gerontol* 2007; 42: 223-232.

[8] Sowell RA, Owen JB, Butterfield DA. Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res Rev* 2009; 8: 1-17.

[9] Caudle WM, Pan S, Shi M, Quinn T, Hoekstra J, Beyer RP, et al. Proteomic identification of proteins in the human brain: Towards a more comprehensive understanding of neurodegenerative disease. *Proteomics Clin Appl* 2008; 2: 1484-1497.

[10] Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, Luca MD. Modeling Alzheimer's disease: from past to future. *Front Pharmacol* 2013; 4: 77.

[11] Benedikz E, Kloskowska E, Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 1034-1042.

[12] Laurijsens B, Aujard F, Rahman A. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discovery Today: Technologies* 2013; 10: e319-e27.

[13] Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 2008; 115: 5-38.

[14] Hoseini O SM, Nobakht M, Mortazavi P, Esmailzadeh B, Rahbar Rooshandel N, Omidzahir SH. Study of histopathological lesions in CA1 of the hippocampus after injection of beta-amyloid in a rat model

- [36] Butterfield DA, Boyd-Kimball D, Castegna A. Proteomics in Alzheimer's disease: insights into potential mechanisms of neurodegeneration. *J Neurochem* 2003; 86: 1313-1327.
- [37] Noorbakhsh FR S. Heat shock proteins (HSPs). Tehran: Andishehsara; 2012.
- [38] Lu RC, Tan MS, Wang H, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *Bio Med Res Internat* 2014; 2014: 8.
- [39] Weng WC, Lee WT, Hsu WM, Chang BE, Lee H. Role of glucose-regulated Protein 78 in embryonic development and neurological disorders. *J Formosan Med Assoc* 2011; 110: 428-437.
- [40] Di Domenico F, Sultana R, Tiu GF, Scheff NN, Perluigi M, Cini C, Butterfield DA. Protein levels of heat shock proteins 27, 32, 60, 70, 90 and thioredoxin-1 in amnesic mild cognitive impairment: an investigation on the role of cellular stress response in the progression of Alzheimer disease. *Brain Res* 2010; 1333: 72-81.
- [41] Plantier M, Der Terrossian E, Represa A. β -Actin immunoreactivity in rat microglial cells: developmental pattern and participation in microglial reaction after kainate injury. *Neurosci Lett* 1998; 247: 49-52.
- [42] Ghadami SA. Amyloid and perion. Isfahan: Behta Pazhouhesh 2011. (Persian).
- in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 223-232.
- [31] Salomonis N, Hanspers K, Zambon AC, Vranizan K, Lawlor SC, Dahlquist KD, Doniger SW, Stuart J, Conklin BR, Pico AR. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 217.
- [32] Summer-Kutmon M. Managing Biological Data in Pathways and Networks. Netherlands: Maastricht University; 2014.
- [33] Curtain CC AF, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, et al. Structural Neuroimaging: Early Diagnosis and Staging of Alzheimer's disease in Alzheimer's disease and related disorders: Etiology, Pathogenesis and Therapeutics. West Sussex, England.; John Wiley & Sons, Ltd; 1999.
- [34] Savioz A, Leuba G, Vallet PG, Walzer C. Contribution of neural networks to Alzheimer disease's progression. *Brain Res Bull* 2009; 80: 309-314.
- [35] Law A, Gauthier S, Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Rev* 2001; 35: 73-96.

Proteomic study in the rat hippocampus as a measure of human Alzheimer's disease

Esra Ghamari (M.Sc)¹, Hakimeh Zali (Ph.D)^{*2}, MostafaRezaie Tavirani (Ph.D)³, SaeedHesami Takalu (Ph.D)⁴, Fatemeh Goshadrou (Ph.D)⁵, Nayebali Ahmadi (Ph.D)³, Sara Zamaheni(M.D)⁶, Ali Rashidy-Pour (Ph.D)⁷

1 – Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 - Proteomics Research Center, School of advanced technologies in medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 - Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 – Dept. of Biology, Central Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5 – Dept. of Physiology, Paramedical Sciences Faculty, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6 - School of Dentistry, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

7 - Research Center and Dept. of Physiology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

(Received: 8 Feb 2015; Accepted: 14 Apr 2015)

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is one of the most common types of dementia. Studying the early stages of AD in human is not possible and thus, most studies are limited to post-mortem brain tissues. Therefore, studying the animal model of AD in order to understand the underlying mechanism and evaluate the molecular processes involved in human form of the disease is inevitable. In this study, with the help of proteomics and bioinformatics, we have studied the proteome of rat hippocampus after injection of A β (1-42) and analyzed the data with clustering method.

Materials and Methods: Proteins were extracted from the normal (N) and AD (A) subjects, whom have been injected with A β (1-42). Proteins were separated by two-dimensional electrophoresis. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue to visualize the protein spots. Proteins in two group samples were analyzed with bioinformatics software's and identified with mass Spectrometry.

Results: Bioinformatic analysis of two-dimensional electrophoretic gels indicated on the presence of 111 specific proteins belong to group N and 67 newly expressed proteins induced by A β (1-42) injection. Changes at the molecular level were statistically analyzed by several variables analysis method, such as clustering and groups of proteins with altered expression were categorized in metabolic and regulatory clusters.

Conclusion: identified proteins in rat hippocampus with AD were similar to human form of the disease. Despite the differences between the human and rat ADs, the study of AD can be established as a rat model of the disease. Injection of A β (1-42) had also reflected changes at the level of proteins, associated with changes in protein conformation occurring in the disease with some alteration in cellular mechanism.

Keywords: Alzheimer Disease, Clustering Analysis, Proteomics, Amyloid beta-Peptides

* Corresponding author. Tel: +98 21 23879848

h.zali@sbm.ac.ir