

آنالیز پروتئین‌های مرتبط با روند صرع‌زایی درگیر در مسیر

پیام‌رسانی cAMP

الهه دشتبان مقدم^۱، شیما خداوردیان^۱، بهاره دبیرمنش^۱، جواد میرنجفی زاده^۲، یعقوب فتح‌اللهی^۲، خسرو خواجه^{۳*}

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات علوم مغز و شناخت دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۵

چکیده

صرع یک بیماری نورولوژیک مزمن است که منجر به اختلال موقت در عملکرد طبیعی مغز می‌شود و حدود یک سوم از مبتلایان به داروهای موجود پاسخ نمی‌دهند. از محتمل‌ترین دلایل آن، می‌توان به عدم شناخت کافی از مکانیسم مولکولی صرع‌زایی و پروتئین‌های کلیدی درگیر در آن اشاره کرد. از این‌رو، شناسایی فرایند صرع‌زایی با هدف توقف یا کنترل این مسیر، می‌تواند به توسعه درمان دارویی مناسب و اثربخش بینجامد. با این هدف در این مطالعه، آنالیز پروتئوم هیپوکمپ موش‌های صحرایی در روند صرع‌زایی با روش کیندلینگ الکتریکی و با استفاده از تکنیک شاتگان پروتئومیکس انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز داده‌های سیستم بیولوژی مشخص شد که مسیر پیام‌رسانی cAMP به عنوان یک مسیر کلیدی در صرع‌زایی ایفای نقش می‌کند و تغییر در بیان پروتئین‌های بالادست و پایین دست این پیام‌رسان در مراحل مختلف کیندلینگ الکتریکی مشاهده شد. از جمله این تغییرات می‌توان به کاهش بیان نوروپپتید سوماتواستاتین از پروتئین‌های بالادستی و افزایش بیان فسفولیپاز ۲D و گیرنده گلوتامات AMPA نوع ۲ از پروتئین‌های پایین‌دستی در طی صرع‌زایی اشاره کرد. این داده‌ها اطلاعات ارزشمندی از تغییرات بیان پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی cAMP و نقش کلیدی آنها در روند صرع‌زایی ارائه می‌دهد که می‌تواند بینش جدیدی در شناخت فرایند صرع‌زایی در هیپوکمپ و معرفی اهداف جدید دارویی مبتنی بر مکانیسم در آینده ایجاد کند.

واژه‌های کلیدی: شاتگان پروتئومیکس، صرع‌زایی، کیندلینگ الکتریکی، هیپوکمپ

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی: khajeh@modares.ac.ir

مقدمه

صرع بیماری مزمن نورولوژیک است که با نارسایی مغزی بازگشت‌پذیر در فواصل زمانی غیرقابل پیش‌بینی در فعالیت طبیعی مغز که به آن تشنجات صرعی گفته می‌شود، تعریف می‌گردد (۹،۱۶). با وجود معرفی روزافزون داروهای ضد صرع، تقریباً ۳۰ درصد افراد مبتلا نسبت به درمان‌های دارویی مقاوم هستند (۱۶). شایان ذکر است که داروهایی که در درمان صرع به کار می‌روند، اغلب ضد تشنج هستند، اما روند صرع‌زایی را متوقف نمی‌کنند و در افرادی که به دارو پاسخ می‌دهند آثار جانبی زیادی دارند (۳۷). از این‌رو همواره نیاز به روشی جدید برای درمان صرع وجود دارد. تأثیر بر روند صرع‌زایی یا معکوس کردن این روند که امروزه مورد توجه قرار گرفته است، می‌تواند روش جدید مداوای این بیماری باشد. عدم شناخت کافی از مکانیسم صرع‌زایی، علت نبودن داروی موثری است که بتواند این روند را متوقف یا معکوس کند (۱،۱۷).

تاکنون دلایل متفاوتی توسط محققین در توضیح روند صرع‌زایی گزارش شده است، با این وجود هنوز مکانیسم مولکولی این روند تا حد زیادی ناشناخته مانده است (۳۲،۳۸). بنابراین شناخت مکانیسم ایجاد صرع و سازوکار مولکولی شروع و توسعه بیماری‌زایی شامل پروتئین‌های درگیر در مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی، می‌تواند این امکان را ایجاد کند که درمان اثربخشی بر جلوگیری از پیشرفت صرع‌زایی ارائه شود. به دلیل غیراخلاقی بودن آزمایش بر روی انسان و عدم امکان فراهم شدن بافت کنترل بیشتر مطالعات صرع بر روی موش صحرایی صرع‌ی شده به عنوان نزدیک‌ترین مدل به صرع انسانی انجام می‌شود. یکی از مدل‌های مورد استفاده در ایجاد موش صرع‌ی مدل کیندلینگ الکتریکی است. در این مدل، با دادن تحریکات زیر حد آستانه، حیوان در ابتدا قادر به ایجاد تشنج نیست. تخلیه متعاقب با ادامه تحریک‌ها گسترش یافته و به تدریج حیوان پنج مرحله رفتار تشنجی بر اساس مقیاس راسین را بروز می‌دهد (۲۶). مزیت مدل کیندلینگ این است که روند صرع‌زایی و پیشرفت تدریجی تشنج با استفاده از آن قابل مشاهده است و تشنجات کنترل شده و تا حدودی قابل پیش‌بینی هستند (۲).

مسیر پیام‌رسانی cAMP و پروتئین‌های بالادست و پایین دست آن نقش کلیدی در ایجاد تشنج دارند (۸،۴۰). در فرایند تشنج، سطح این پیام‌رسان ثانویه افزایش پیدا می‌کند و از سوی دیگر، افزایش cAMP آستانه القای تشنج را نیز کاهش می‌دهد (۳ و ۸). نقش cAMP در اختلالات تشنجی، به طور گسترده هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است و تأثیر غلظت cAMP در تضعیف تشنج مشاهده شده است (۸). همچنین، گزارشات متناقض دیگری که در آنها نقش cAMP در ایجاد صرع ارائه شده است نیز وجود دارند (۲۳،۲۵) با این حال، تا کنون مطالعه جامعی از بررسی تغییرات پروتئین‌های درگیر در این فرایند پیچیده و چند عاملی صورت نگرفته است و نقش این پیام‌رسان ثانویه، در پیشروی صرع هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۳). شناسایی مکانیسم اثر این پیام‌رسان ثانویه در روند صرع‌زایی و پروتئین‌هایی که در بالادست و پایین دست آن فعال می‌شوند و یا تغییر بیان دارند، ممکن است بتواند به شناختی کامل‌تر از مکانیسم‌های سلولی و مولکولی درگیر در ایجاد صرع و در نهایت به توسعه درمان دارویی اثربخش و کاهش بیمارمان مقاوم به داروهای ضدصرع بیانجامد.

بنابراین در این مطالعه، به منظور آشکارسازی این جنبه مبهم از مکانیسم صرع‌زایی با استفاده از تکنیک پروتئومیکس مقایسه‌ای نشانه‌گذاری شده با TMT، جفت‌شده با nano LC-MS/MS به بررسی تغییرات پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی cAMP در مراحل پیشرفت کیندلینگ الکتریکی شامل مرحله ۳ (کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک) به عنوان مرحله‌ای که حیوان در میانه کیندلینگ قرار دارد و مرحله ۵ (ایستادن روی هر دو پا و از دست دادن تعادل و انتشار تشنج به کل بدن) به عنوان مرحله‌ای که حیوان به طور کامل کیندل شده است در مقایسه با مرحله ششم یا کنترل که در آن حیوان فقط جراحی شده و تحریکی دریافت نکرده است؛ پرداخته شد. نتایج این پژوهش تغییرات قابل توجهی در بیان پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی cAMP را نشان داد که می‌تواند تأییدی بر اهمیت این مسیر در مکانیسم صرع‌زایی باشد. این پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان مارکرهای محتمل با هدف توسعه درمان‌های مؤثر دارویی مبتنی بر مکانیسم، در روند صرع‌زایی مطرح شوند.

مواد و روش‌ها

جراحی حیوانات

در مطالعه حاضر، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۶-۵ هفته در زمان جراحی) که به صورت جداگانه در قفس‌هایی در دمای اتاق °C ۲۲-۲۵ و یک دوره ۱۲ ساعته روشنایی/۱۲ ساعته تاریکی (نور از ۶:۰۰ صبح تا ۶:۰۰ بعدازظهر) نگهداری شدند، استفاده شد. حیوانات آب و غذا به صورت مشابه دریافت کردند. تمام مراحل آزمایش‌ها و مراقبت از

حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های بین‌المللی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده و توسط کمیته اخلاقی (کد اخلاق: IR.TMU.REC.1394.268) تحقیقات حیوانی دانشگاه تربیت مدرس تایید شد که مطابق با راهنمای NIH برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی است. همچنین سعی شد، تعداد حیوانات مورد استفاده و رنج بردن آنها به حداقل برسد. در این مطالعه موش‌های صحرایی به ۳ گروه شامل شم یا کنترل، مرحله ۳ (S3) و مرحله ۵ (S5) تقسیم شدند.

به منظور اعمال تحریکات الکتریکی، الکترودها از طریق جراحی Steriotaxic به داخل ناحیه CA1 هیپوکمپ در هر ۳ گروه مورد مطالعه وارد شدند. حیوانات با استفاده از نسبتی از داروهای کتامین و زایلازین (سیگما؛ انگلستان) به میزان ۱۰/۱۰۰ کیلوگرم/میلی‌گرم و به صورت داخل صفاقی، بیهوش شده و سپس در دستگاه Steriotaxic ثابت و جراحی شدند. هدف استفاده از کتامین و زایلازین بیهوشی بلند مدت برای جراحی کاشت الکتروده است. موش بعد از چند روز ریکاوری وارد مطالعه می‌شود و اثرات ماده بیهوشی برطرف شده است. سپس یک الکتروده تحریکی دوقطبی و یک الکتروده ثبت‌کننده به هم پیچیده شدند (الکتروده سه قطبی) و در ناحیه CA1 در هیپوکمپ راست، در ۲/۴ میلی‌متری خلفی و ۱/۸ میلی‌متری جانبی برگما و ۲/۸ میلی‌متر زیر جمجمه قرار گرفت (۳۳). همچنین یک الکتروده تک قطبی متصل به پیچ فولادی ضد زنگ به عنوان الکتروده مرجع در بالای جمجمه و در سمت چپ الکتروده سه قطبی قرار گرفت.

کیندلینگ الکتریکی

پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز دوره ریکاوری، گروه‌های مرحله ۳ (S3) و مرحله ۵ (S5)، تحریک الکتریکی برای پیشرفت روند کیندلینگ را دریافت کردند. در مطالعه حاضر از روش کیندلینگ نیمه سریع استفاده شد که در این روش حیوانات با یک مربع تک موج با طول پالس ۱ میلی‌ثانیه، فرکانس ۵۰ هرتز به مدت ۲ ثانیه تحریک شدند. رفتارهای تشنجی بر اساس مقیاس تعیین شده توسط راسین، به ۵ دسته شامل حرکت دهان و صورت (مرحله ۱)، حرکت سر به طرف بالا و پایین (مرحله ۲)، کلونوس اندام جلویی طرف مقابل نسبت به محل تحریک (مرحله ۳)، کلونوس اندام جلویی دو طرف و ایستادن روی هردو پا (مرحله ۴) و ایستادن روی هر دو پا و از دست دادن تعادل و انتشار تشنج به کل بدن (مرحله ۵) طبقه بندی شدند (۲۶). تحریک‌ها هر ۲۰ دقیقه یک بار و ۶ بار در روز تا زمان نشان دادن مرحله ۳ برای گروه دوم و مرحله ۵ برای گروه سوم تکرار شد. ثبت امواج مغزی روی رایانه با استفاده از نرم‌افزار eTrace experiment 1.39 (موسسه پرتودانش؛ ایران) و تحلیل برون خط (Offline analysis) آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار eTrace analysis 2 (موسسه پرتودانش؛ ایران) در محیط ویندوز انجام گرفت.

نمونه برداری از هیپوکمپ

۲۴ ساعت بعد از آخرین تحریک، حیوانات با استفاده از اتر بیهوش شدند، سر آن‌ها قطع شده و مغز از جمجمه خارج شد. علت استفاده از اتر برای بیهوشی کوتاه مدت و با هدف قربانی کردن موش بلافاصله پس از بیهوشی است. سپس هیپوکمپ از سایر قسمت‌های مغز جدا شده به میکروتیوپ منتقل شد. نمونه‌های هیپوکمپ پس از تهیه به سرعت در نیتروژن مایع قرار گرفته و به دمای -80°C برای انجام آزمایش‌های بعدی منتقل شدند.

شات‌گان پروتئومیکس

فرآیند تحلیل پروتئوم هیپوکمپ با بهره‌گیری از یکی از پیشرفته‌ترین تکنیک‌های پروتئومیکس مبتنی بر شات‌گان؛ یعنی روش TMT labeling LC-MS/MS که تلفیقی از کروماتوگرافی مایع و طیف سنجی جرمی با رویکرد پپتیدهای

نشانه‌گذاری شده است، انجام شد (۱۹). به منظور استخراج پروتئوم، بافت هیپوکمپ وزن شده و توسط هموژنایزر دستی در بافری که حاوی ۸ مولار اوره، ۰/۱ مولار تریس-اسید کلریدریک (سیگما؛ انگلستان) در $\text{pH}=8$ و مهارکننده پروتئاز بود لیز شد. سپس تخریب بافتی با استفاده از امواج صوتی کامل شده و محلول رویی از بقایای بافت با استفاده از سانتریفیوژ دور بالا (۱۲۰۰g) به دقت جدا شد. غلظت پروتئین با استفاده از روش بایسینکونینیک اسید یا BCA تعیین شد (۳۶). با افزودن ۱۰ میلی‌مولار DTT (سیگما؛ انگلستان) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق مخلوط پروتئین احیا شد. سپس آلکیلاسیون با ۲۰ میلی‌مولار یدوواستامید (سیگما؛ انگلستان) به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انجام گرفت. مخلوط پروتئینی حاصل با بیکربنات تری اتیل آمونیوم (TEAB) ۵۰ میلی‌مولار رقیق شد و در حجم مناسب تریپسین (۱ میکروگرم بر میکرولیتر) به طوری که نسبت تریپسین: مخلوط پروتئین در نمونه ۵۰:۱ (وزنی/وزنی) باشد، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک شب تیمار شد. محصول هضم شده در ستون Oasis HLB نمک‌زدایی و مخلوط پپتیدهای شسته شده با استونیتریل ۶۰٪ توسط سانتریفیوژ خلاء لیوفیلیزه شد. نمونه‌های پپتید خشک شده در TEAB ۱۰۰ میلی‌مولار در برجسب Tandem Mass Tag (TMT) حل شدند. با استفاده از دستورالعمل سازنده، ۱۰۰ میکروگرم پروتئین از هر تکرار بیولوژیکی با TMT نشاندار شدند. پپتیدهای نشاندار با TMT با استفاده از کروماتوگرافی با فاز معکوس با pH بالا^۲ جداسازی شدند.

آنالیز طیف سنجی جرمی

نمونه‌های هیپوکمپ به منظور آنالیز پروتئومیکس، به آکادمی علوم چین ارسال شد. آزمایش‌های NanoLC-MS / MS توسط طیف سنج جرمی Q-Exactive جفت شده با سیستم Easy-nLC 1000 HPLC (Thermo Scientific, Germany) انجام گرفت. پپتیدهای نشاندار بر ستون سیلیکا ۱۰۰ میکرومتر $2 \times$ سانتی‌متر قرار داده شده و سپس با ستون C18 فاز معکوس جدا شد. پپتیدهای بارگذاری شده با یک شیب خطی ۷۸ دقیقه‌ای شسته شدند. حلال A شامل ۰/۱٪ اسید فرمیک در آب و حلال B شامل ۰/۱٪ اسید فرمیک در استونیتریل بود. تجزیه و تحلیل MS با طیف سنج جرمی Q-Exactive انجام شد. داده‌های MS با رزولوشن بالا (۷۰,۰۰۰ m/z) در محدوده جرم ۱۶۰۰-۳۰۰۰ m/z بدست آمد. ۲۰ یون برتر از هر اسکن کامل MS با عرض جداسازی ۲ m/z برای قطعه قطعه شدن با انرژی برخورد نرمال ۳۲٪ انتخاب شدند.

شناسایی پروتئین‌ها و کمی‌سازی آنها

طیف کروماتوگرام خام به دست آمده از آنالیز نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار محاسباتی Proteome Discoverer (version 2.2.0.388 Thermo Scientific, Germany) پردازش شد. شناسایی پروتئین‌ها با موتور جستجوگر Sequest HT در مقایسه با پایگاه داده UniProt *Rattus norvegicus* (به روز شده در تاریخ ۱۰-۲۰۱۷) انجام گرفت. تنظیمات پیش فرض برای جستجو شامل: دارا بودن حداقل ۶ اسیدآمینه جهت شناسایی پپتیدها، انتخاب آنزیم تریپسین، مجاز بودن دو جایگاه برش از دست رفته و اعمال حدآستانه معادل ۱٪ برای نرخ کشف کاذب^۳ جهت شناسایی پروتئین‌ها و پپتیدها بودند. شدت سیگنال تمام پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده از پروتکل نشانه‌گذاری TMT، محاسبه شد. پروتئین‌هایی که نسبت به گروه کنترل دارای تغییرات معنادار هستند با معیار زیر غربال می‌شوند: حداقل دو پپتید از آن پروتئین برای شناسایی مورد استفاده قرار گرفته

^۱bicinchoninic acid^۲high-pH reversed-phase chromatography^۳False discovery rate

باشد. شرط دوم برای غربال‌گری پروتئین‌ها این است که تغییرات fold change بیشتر از ۱/۲ برابر برای افزایش بیان و کمتر از ۰/۸ برای کاهش بیان وجود داشته باشد.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی و آماری

داده‌های پروتئومیکی با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیکی تحت وب PANTHER (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships, <http://pantherdb.org>) مورد طبقه‌بندی عملکردی قرار گرفتند. PANTHER یک ابزار بیوانفورماتیکی است که به منظور آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژن، لیست ژنی مورد نظر کاربر را به عنوان ورودی دریافت نموده و سپس اطلاعات مرتبط با این ژن‌ها را در منابع و پایگاه داده‌های زیستی جستجو می‌نماید (۲۱). به منظور آنالیز مسیرهای پیام‌رسانی بر اساس پایگاه داده KEGG از موتور جستجوگر DAVID 6.8 (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, david.ncifcrf.gov/home.jsp) استفاده شد (۳۳). آنالیز آماری با سه تکرار تکنیکی و ۳ تکرار بیولوژیکی به صورت مخلوط شده انجام گرفت. نتایج کمی با استفاده از پلتفرم R package (<https://www.r-project.org/>) version 4.1.0 و با آزمون آماری Shapiro-Wilk test مورد بررسی قرار گرفت و به دلیل اینکه توزیع داده‌ها نرمال نبود از آزمون ناپارامتریک برای آنالیزهای آماری استفاده شد.

نتایج

با انجام جراحی و قرار دادن الکترودها در ناحیه CA1 و پس از گذشتن دوره ریکاوری، آستانه‌گیری با اعمال تحریک‌های الکتریکی اولیه بر روی ۳ گروه مورد بررسی انجام گرفت. تحریک روزانه حیوانات ادامه داده شد تا زمانی که رفتارهای تشنجی مرحله ۳ و مرحله ۵ پنجم در مقیاس راسین مشاهده شود و ۲۴ ساعت پس از مشاهده رفتار تشنجی نمونه هیپوکمپ جداسازی شد. پس از انجام آنالیز پروتئوم با استفاده از روش شاتگان، ۶۸۷۳ پروتئین شناسایی شدند، که از آن‌ها تعداد ۶۵۰۳ پروتئین از نظر کمی تعیین مقدار شده بود. در مقایسه گروه مرحله ۳ با کنترل به عنوان مرحله میانی در صرع‌زایی، تعداد ۳۹۸ پروتئین دچار تغییرات معنادار شده بود که ۲۶۹ پروتئین افزایش بیان و ۱۲۹ پروتئین کاهش بیان داشتند. در مقایسه مرحله ۵ با کنترل تعداد ۷۳۷ پروتئین دارای تغییرات معنادار شدند که از آن تعداد ۳۹۱ پروتئین افزایش بیان و ۳۴۶ پروتئین کاهش بیان نشان می‌دهند و در نهایت با مقایسه گروه مرحله ۵ نسبت به مرحله ۳ تعداد ۳۷۲ پروتئین تغییر بیان داشته‌اند که از میان آنها ۱۱۴ پروتئین افزایش بیان و ۲۵۸ پروتئین کاهش بیان داشته‌اند.

آنالیزهای هستی‌شناسی

در مرحله بعد هر مجموعه پروتئین با استفاده از نرم‌افزار PANTHER مورد تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (Gene Ontology) یا به اختصار GO قرار گرفت که نتایج در شکل (۱) نشان داده شده است. خروجی این ابزار لیستی شامل اصطلاحات غنی‌سازی ژن همراه با تعداد ژن‌های مؤثر در آنهاست که مرتبط با هستی‌شناسی ژن، مسیرها و بیماری‌های مرتبط با ژن‌های ورودی هستند. نتایج آنالیز GO برای زیرمجموعه‌های پروتئینی با بیان متفاوت در ۳ حالت از مقایسه جفتی گروه‌ها انجام گرفت.

بر اساس نتایج به دست آمده از این آنالیز، در مقایسه گروه‌های مرحله ۳ با کنترل، پروتئین‌های با بیان متمایز در فرایند بیولوژیکی یا BP^۱، فعال شدن سیستم کمپلمان دارای بیشترین تغییر بیان هستند و پس از آن، پروتئین‌های مرتبط با پاسخ به استرس، آندوسیتوز، انتقال،^۲ تحرک سلولی^۳ و گلیازایی به ترتیب قرار می‌گیرند. در گروه اجزاء سلولی یا CC^۴ به ترتیب پروتئین‌های مربوط به ارگانل‌های متصل به غشا،^۵ و زیکول‌های خارج سلولی، سیتوپلاسم و سیناپس قرار دارند. در گروه عملکرد سلولی یا MF^۶، فعالیت مهارکننده‌های آنزیمی،^۷ مولکول‌های مربوط به اتصالات سلولی،^۸ فعالیت آنزیم‌های تنظیمی به ترتیب بیشترین غنی‌سازی را نشان می‌دهند.

در مقایسه گروه مرحله ۵ نسبت به مرحله ۳ آنالیزهای GO در گروه BP نشان‌دهنده بیشترین تغییرات در فرایندهای پیام‌رسانی سیناپسی، مرگ سلولی، نوروژنایی و تغییر در ساختار سیناپس است. در گروه CC سیتوپلاسم، نرون، سیناپس، نوکلئوزوم، کمپلکس DNA - پروتئین، دندریت و آکسون قرار گرفته‌اند. در گروه MF بیشترین غنی‌سازی در مورد اتصال دم پلی A، مهارکننده‌های آنزیمی، اتصال کربوکسیلیک اسیدها، عملکرد ترانسپورتری و فعالیت کانال‌های کاتیونی وابسته به ولتاژ مشاهده شد.

در مقایسه گروه مرحله ۵ نسبت به کنترل، آنالیزهای GO در گروه BP، بیشترین معناداری در تنظیم ساختار و فعالیت سیناپس، رشد و نمو نرون، انتقال آمینواسید و انتقال پیام سیناپسی توسط انتقال دهنده‌های عصبی و نوروپپتیدها قرار دارند. در گروه CC به ترتیب سیتوپلاسم، ارگانل‌های متصل به غشا، نرون، شبکه اندوپلاسمی، سیناپس و دندریت بیشترین معناداری را نشان می‌دهند. در گروه MF نیز آنالیزها نشان‌دهنده بیشترین تغییرات در اتصال به دم پلی A، انتقال سوبسترای اختصاصی، انتقال دهنده‌های گذر از غشایی آمینواسیدی، فعالیت گیرنده‌های GABA و اتصال کربوکسیلیک اسیدها می‌باشد.

آنالیز مسیرهای پیام‌رسانی

به منظور گروه‌بندی پروتئین‌های تغییر بیان داشته در مکانیسم‌های بیولوژیکی و آنالیز مسیرهای پیام‌رسانی سلولی پایگاه داده KEGG^۹ که حاوی ارتباطات مولکولی بین پروتئین‌ها در مسیرهای بیوشیمیایی و مکانیسم بیماری‌ها است، مبنا قرار گرفت (۱۲،۲۲). با استفاده از موتور جستجوگر DAVID مسیرهای پیام‌رسانی KEGG از پروتئین‌های با تغییر بیان معنادار در مقایسه بین گروه‌ها دو به دو آنالیز شد (شکل ۲). با توجه به نتایج به دست آمده، این‌گونه بنظر می‌رسد که مسیر پیام‌رسانی cAMP به عنوان مسیری که در مقایسه بین هر سه گروه با یکدیگر تغییرات معنادار قابل توجهی نشان می‌دهد، نقش پررنگی در صرع‌زایی و پیشروی صرع داشته باشد؛ بنابراین در ادامه این مطالعه به بررسی دقیق‌تر این مسیر و پروتئین‌های درگیر در آن پرداخته شد.

با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه داده KEGG برای موش صحرایی، ۲۲۱ پروتئین در مسیر پیام‌رسانی cAMP نقش دارند. در این مطالعه، با استفاده از روش شاتگان پروتئومیکس، ۹۱ پروتئین از پروتئین‌های دخیل در این مسیر شناسایی شد. در مقایسه بین گروه مرحله ۳ با گروه کنترل ۱۲ پروتئین افزایش بیان و ۷ پروتئین کاهش بیان داشتند. در مقایسه بین گروه

^۱Biological Process

^۲Transport

^۳Cell motility

^۴Cellular Component

^۵Membrane-bonded organelle

^۶Molecular Function

^۷Enzyme inhibitor activity

^۸Cell adhesion molecule binding

^۹Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

مرحله ۵ با کنترل، ۳۵ پروتئین افزایش و ۵ پروتئین کاهش بیان نشان می‌دهند و در مقایسه بین مرحله ۵ نسبت به مرحله ۳، ۲۱ پروتئین افزایش بیان و ۲ پروتئین کاهش بیان نشان می‌دهند. جداول ۱-۳ نمایانگر این پروتئین‌ها و نسبت تغییرات آنها است. با استفاده از نمودار Venn پروتئین‌های مشترک بین هر دو گروه دو به دو شناسایی شدند که در شکل ۳ مشاهده می‌شوند. بر اساس این نمودار ۳ پروتئین که در هر سه مقایسه بین گروه‌ها یعنی مقایسه گروه مرحله ۳ نسبت به کنترل، گروه مرحله ۵ نسبت به کنترل و گروه مرحله ۵ نسبت به مرحله ۳ تغییر کرده‌اند، شامل پروتئین‌های سوماتواستاتین (SST)، گیرنده گلوتامات AMPA نوع ۲ (GRIA2) و فسفولیپاز D2 (PLD2) می‌باشند. حضور این ۳ پروتئین در مرکز تغییرات نمودار Venn نشان می‌دهد که احتمالاً این پروتئین‌ها می‌توانند نقش پر اهمیت تری در صرع‌زایی داشته باشند. تغییرات بیان این پروتئین‌ها در شکل ۴ با جزئیات بیشتر نشان داده شده است.

بحث

بر اساس مطالعات پیشین بر روی مکانیسم مولکولی صرع، نقش مسیر پیام‌رسانی cAMP و پروتئین‌های بالادست و پایین دست آن مشخص شده است (۸،۳۸). طی فرایند تشنج، سطح این پیام‌رسانان افزایش پیدا می‌کند و به نظر می‌رسد که آستانه تشنج را نیز کاهش می‌دهد (۳۸). غلظت cAMP، در پاسخ به محرک‌های مختلفی از جمله انتقال‌دهنده‌های عصبی، فاکتورهای رشد و هورمون‌های پپتیدی افزایش می‌یابد. نقش cAMP در ایجاد صرع به دو نقش آنی و دیرپای تقسیم می‌شود (۲۰). اثرات آنی، ناشی از فسفریلاسیون کانال‌ها و گیرنده‌های ایپلپتیک نظیر محرک‌های نورونی می‌باشد و اثرات دیرپای، تغییرات در بیان پروتئین‌های دخیل در صرع‌زایی را شامل می‌شود که این تغییرات در بیان پروتئین‌ها غالباً توسط فاکتور رونویسی مرتبط با cAMP یا CREB ایجاد می‌شوند (۴۰). بنابراین با توجه به اهمیت مسیر پیام‌رسانی cAMP، ما به بررسی این مسیر و پروتئین‌های درگیر در آن در طی فرایند صرع‌زایی با مدل کیندلینگ الکتریکی و با استفاده از روش شاتگان پروتئومیکس با تکنیک LC-MS/MS پرداختیم. بر اساس نمودار Venn (شکل ۳)، پروتئین‌های GRIA2، PLD2 و در هر سه گروه دارای تغییرات معنادار هستند که در ادامه به نقش آنها در صرع‌زایی اشاره شده است.

سوماتواستاتین (SST) نوروپیتیدی است که در CNS بیان می‌شود و نقش مهمی به عنوان تنظیم‌کننده عملکرد نورون ایفا می‌کند (۲۷). SST با گیرنده‌های G پروتئینی از نوع مهاری جفت می‌شود و بر روی مسیر پیام‌رسانی cAMP کنترل منفی دارد (۲۷). در این مطالعه نشان داده شد که بیان این پروتئین بصورت قابل توجهی کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش بیان آن منجر به افزایش تولید cAMP و افزایش عملکرد پروتئین‌های پایین دست از جمله پروتئین کیناز A (PKA) و در نتیجه فاکتور رونویسی CREB می‌شود. در مطالعات پیشین مشاهده شده است که افزایش فعالیت طولانی مدت CREB در پیشبرد و توسعه تشنجات صرعی دخالت دارد و موش‌هایی که کاهش سطح این فاکتور را نشان می‌دهند تا ۵۰ درصد نسبت به القای تشنج مقاوم می‌شوند (۳۹،۴۲). از جمله پروتئین‌هایی که در پایین دست در اثر افزایش عملکرد CREB دچار اختلال در بیان می‌شوند، BDNF است که افزایش بیان آن در مرحله ۳ و ۵ نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. افزایش بیان این پروتئین در گزارشات پیشین هم مشاهده شده است (۱۱،۱۵). SST همچنین می‌تواند با تاثیر بر گیرنده NMDA و کاهش فسفریلاسیون آن منجر به کاهش القای پیام تحریک در نورون پس سیناپسی شود (۲۷). با توجه به نقش قابل توجه این گیرنده در القای تشنج احتمالاً کاهش فعالیت SST می‌تواند منجر به افزایش فعالیت NMDA و در نتیجه افزایش احتمال تشنج شود. علاوه بر این، SST آزادسازی گلوتامات از نورون‌های پیش سیناپسی را مهار می‌کند و کاهش آن می‌تواند منجر به افزایش آزادسازی گلوتامات و افزایش احتمال القای تشنج شود (۱۰،۳۷). بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که کاهش بیان پروتئین SST

مشاهده شده، می‌تواند باعث اختلال در مسیر cAMP و مسیرهای مرتبط به آن از جمله مسیر پیام‌رسانی کلسیم، آزادسازی انتقال دهنده‌های عصبی گلوتامات و GABA شود که برآیند آنها در نهایت منجر به القای تشنج در بافت هیپوکمپ شود.

در مرکز تغییرات در نمودار Venn تغییرات بیان پروتئین فسفولیپاز D2 نیز مشاهده شد. آنزیم فسفولیپاز D با دو ایزوفرم ۱ و ۲ منجر به هیدرولیز فسفاتیدیل کولین و تولید فسفاتیدیک اسید و کولین می‌شود که عملکردهای مهمی در تنظیم سلولی را برعهده دارند (۴). از جمله مهمترین آنها در بافت عصبی می‌توان به فعال شدن آستروسیت‌ها، افزایش آگزوسیتوز، بازآرایی اسکلت سلولی و آپتوز اشاره کرد که نقش این فرآیندها در ایجاد بافت صرعی گزارش شده است (۵،۱۴،۲۹). در مدل موشی صرع نیز، افزایش القای بیان هر دو ایزوفرم این آنزیم در هیپوکمپ بعد از القای تشنج مشاهده شده است (۱۴). با این حال تاکنون مطالعه جامعی از تغییرات این آنزیم در روند صرع‌زایی و ارتباط آن با بیان سایر پروتئین‌ها انجام نشده است. بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه به نظر می‌رسد این آنزیم نیز تحت تنظیم پیامبر ثانویه cAMP و پروتئین‌های بالادست آن قرار داشته باشد که می‌تواند نقش کلیدی در مکانیسم صرع‌زایی ایفا کند.

گیرنده گلوتامات AMPA پروتئین دیگری است که در مرکز نمودار Venn مشاهده می‌شود و افزایش بیان معناداری در مقایسه بین گروه‌ها و به خصوص گروه مرحله ۵ با کنترل نشان می‌دهد. نقش این گیرنده به عنوان یکی از مهمترین گیرنده‌های گلوتامات در شروع تشنجات صرعی در انسان و مدل موشی گزارش شده است (۲۸،۳۱). طبق مطالعاتی که در مورد مکانیسم عمل این گیرنده انجام گرفت، مشاهده شد که فسفریلاسیون این گیرنده از مسیر پیام‌رسانی cAMP و PKA، می‌تواند مسیر انتقال سیناپسی گلوتامات و در نتیجه تحریک‌پذیری نورون‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (۳۲). این افزایش بیان در نتیجه داده‌های مطالعه پیش‌رو و هم‌راستا بودن آن با مسیر پیام‌رسانی cAMP نیز تایید شده است (۷). احتمالاً این تاثیر با افزایش بیان و یا افزایش مدت فعالیت این گیرنده منجر به تحریک‌پذیری بیش از حد نورون شده و پتانسیل ایجاد تشنجات صرعی را بالا می‌برد.

مسیر پیام‌رسانی cAMP با مسیر پیام‌رسانی کلسیم نیز ارتباط تنگاتنگی دارد و با کنترل کانال‌های وابسته به کلسیم در تنظیم غلظت آن نقش پررنگی ایفا می‌کند (۱۸). طبق مطالعات پیشین در گروه ما مشخص شد که جریان کلسیم به داخل سلول از طریق گیرنده‌ها و کانال‌های غشایی، نقش مهمی در مکانیسم صرع‌زایی ایفا می‌کند (۳۰). بررسی پروتئین‌های مسیر کلسیم درگیر در مکانیسم صرع‌زایی که با استفاده از روش LC-MS/MS شناخته شده‌اند نیز توسط گروه ما بررسی شده است (۱۳). با مقایسه پروتئین‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی کلسیم و مسیر پیام‌رسانی cAMP که توسط تکنیک شاتگان پروتئومیکس شناسایی شده است، ۱۰ پروتئین که تغییرات معنادار داشته‌اند، شامل زیرواحدهای a و b گیرنده NMDA نوع ۲، گیرنده NMDA نوع ۱، آنزیم آدنیلیل سیکلاز ۱ و ۹، آنزیم کالمودولین کیناز ۲ زیرواحد b، انتقال دهنده غشایی کلسیم ATPase نوع ۴، نوع ۲ و نوع ۳، کانال پروتئینی آزادکننده کلسیم نوع ۱ بین این دو مسیر مشترک هستند که تاییدی بر ارتباط تنگاتنگ این دو مسیر پیام‌رسانی می‌باشد. به نظر می‌رسد تحریک مسیر تولید cAMP توسط آزادسازی کلسیم و انتقال غشایی آن با فعال شدن آدنیلات سیکلازها انجام می‌شود که در نهایت با فعال کردن پروتئین کیناز A و گیرنده‌های گلوتامات در پایین دست منجر به افزایش اثر پیام تحریکی می‌شود و در نتیجه به ایجاد تشنج صرعی می‌انجامد (۴۱). ایزوفرم‌های مختلف آنزیم آدنیلیل سیکلاز به طور مستقیم و غیر مستقیم توسط کلسیم تحت تنظیم قرار دارند (۶). از سوی دیگر فعالیت گیرنده NMDA نقش به‌سزایی در افزایش کلسیم سلولی دارد که می‌تواند آنزیم آدنیلیل سیکلاز ۱ (AC1) را فعال کند. افزایش بیان هر دو پروتئین AC1 و گیرنده NMDA در این مطالعه مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه مشخص شد که تنظیم پیچیده مسیر پیام‌رسانی مرتبط با پیامبر ثانویه cAMP و پروتئین‌های درگیر در آن نقش مؤثری در هیپوکمپ طی فرایند صرع‌زایی ایفا می‌کنند که می‌تواند بر شدت بروز تشنج در هر مرحله تاثیر بگذارد. برای رسیدن به اهداف دارویی اختصاصی بر مبنای مکانیسم عمل این مسیر، نیاز به شناخت بهتر از نحوه بیان پروتئین‌های بالادستی و پایین دستی cAMP وجود دارد که می‌تواند با تکیه بر رویکردهای جدید مانند شاتگان پروتئومیکس محقق شود. بر مبنای مطالعات با مدل‌های حیوانی بر مکانیسم صرع‌زایی امروزه می‌دانیم که تغییرات سلولی و مولکولی منجر به کاهش آستانه ایجاد تشنج می‌شود و به پیشرفت صرع می‌انجامد. بنابراین انجام چنین مطالعاتی می‌تواند راه را برای شناخت بیشتر این مسیر پیام‌رسانی و دست‌ورزی پیام cAMP هموارتر کند و منجر به معرفی اهداف دارویی جدید به منظور کاهش درصد بیماران مقاوم به دارو گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

جدول ۱: پروتئین‌های با بیان معنادار مرتبط با مسیر پیام‌رسانی cAMP در مقایسه مرحله ۳ (S3) با کنترل

Gene	Protein description	S3/control
VAV1	guanine nucleotide exchange factor VAV	2
PLD1	phospholipase D1/2	2
GRIA4	glutamate receptor 4	1.8
GRIA1	glutamate receptor 1	1.8
RAP1A	Ras-related protein	1.5
GRIA2	glutamate receptor 2	1.5
PPP1CC	serine/threonine-protein phosphatase PP1 catalytic subunit	1.3
ADCY1	adenylate cyclase 1	1.4
ATP1B3	sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta	1.4
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1.8
ACOX1	acyl-CoA oxidase	1.3
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II	0.7
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II	1.4
ATP2B4	P-type Ca ²⁺ transporter type 2B	0.5
SOX9	transcription factor SOX9	0.6
HTR4	5-hydroxytryptamine receptor 4	0.6
SST	Somatostatin	0.6
PLD2	phospholipase D1/2	1.5

جدول ۲: پروتئین‌های با بیان معنادار مرتبط با مسیر پیام‌رسانی cAMP در مقایسه مرحله ۵ (S5) با کنترل

Gene	Protein description	S5/control
ORAI1	Ca ²⁺ release-activated Ca ²⁺ channel protein 1	3
ATP1B3	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase β	2
GRIA4	glutamate receptor 4	2.4
GRIA1	glutamate receptor 1	2.5
VAV1	guanine nucleotide exchange factor VAV	2
GRIA2	glutamate receptor 2	2.4
ATP2B3	P-type Ca ²⁺ transporter 2B	1.8
PPP1R1B	protein phosphatase 1 regulatory 1B	1.8
PLD1	phospholipase D1/2	1.8
ACOX1	acyl-CoA oxidase	1.8
ADCYAP1R1	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor	1.7
ADCY5	adenylate cyclase 5	1.7
ATP1B4	sodium/potassium-transporting ATPase β	1.7
ATP1B2	sodium/potassium-transporting ATPase β	1.6
GRIN2A	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A	1.5
ATP2B2	P-type Ca ²⁺ transporter 2B	1.5
GRIN2B	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	1.5
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	1.6
ADCY9	adenylate cyclase 9	1.5
ATP1A2	sodium/potassium-transporting ATPase α	1.6
ATP1B1	sodium/potassium-transporting ATPase β	1.8
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	1.7
SLC9A1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger)	1.5
GABBR1	GABA type B receptor	1.5
GABBR2	GABA type B receptor	1.4
ATP1A1	Na ⁺ /K ⁺ -transporting ATPase α	1.4
RAP1A	Ras-related protein Rap-1A	1.5
ADORA1	adenosine receptor A1	1.6
R-Ras	Ras-related protein	1.3
ATP1A3	Na ⁺ /K ⁺ -transporting ATPase α	1.5
GNAI3	guanine nucleotide-binding protein G(i) α	1.4
GRIN1	glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	1.8
SST	Somatostatin	0.5
NFKB1	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	0.7
CAMK2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II	1.6
SOX9	transcription factor SOX9	0.7
PLD2	phospholipase D1/2	1.8

جدول ۳: پروتئین‌های با بیان معنادار مرتبط با مسیر پیام‌رسانی cAMP در مقایسه مرحله ۵ (S5) با مرحله ۳ (S3)

Gene	Protein description	S5/S3
ATP2B4	P-type Ca ²⁺ transporter 2B	2.5
ORAI1	calcium release-activated calcium channel protein 1	2.3
HTR4	5-hydroxytryptamine receptor 4	2.3
ADCYAP1	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide	2.1
ATP1B1	sodium/potassium-transporting ATPase β	2.2
PPP1R1B	protein phosphatase 1 regulatory 1B	2
ATP1B4	sodium/potassium-transporting ATPase β	2
ATP1B2	sodium/potassium-transporting ATPase β	2
GRIN1	glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	1.8
ATP2B3	P-type Ca ²⁺ transporter 2B	1.8
PLD2	phospholipase D1/2	1.7
ADCYAP1R1	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor	1.5
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	1.8
GRIN2B	glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B	1.5
ATP1B3	sodium/potassium-transporting ATPase β	1.8
GRIA2	glutamate receptor 2	1.8
ADCY9	adenylate cyclase 9	1.5
ATP1A2	sodium/potassium-transporting ATPase α	1.6
ATP1A3	sodium/potassium-transporting ATPase α	1.5
NFKB1	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit	0.6
SST	Somatostatin	0.5

زیرنویس شکل‌ها

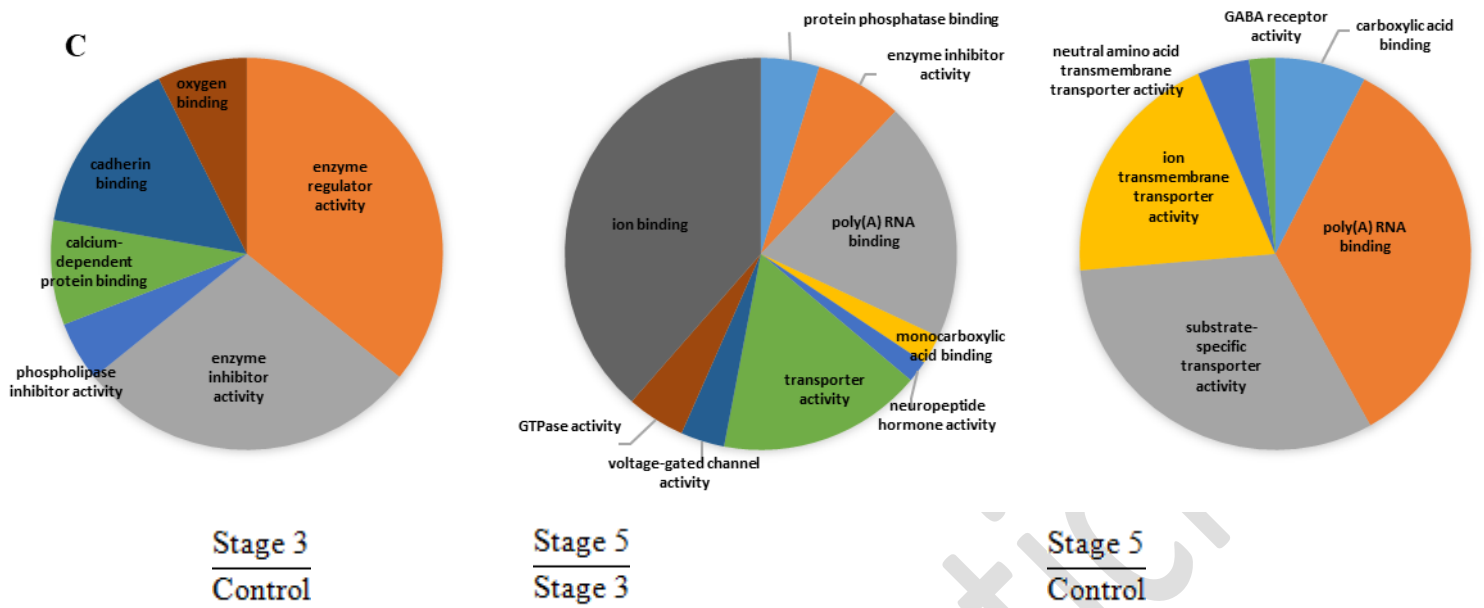
شکل ۱: نمودار دایره‌ای آنالیز هستی‌شناسی (GO) که توسط نرم‌افزار تحت وب PANTHER آنالیز شده است را در مقایسه ۳ گروه به صورت دو به دو نشان می‌دهد. A: فرایندهای بیولوژیکی (BP)، B: اجزای سلولی (CC)، C: عملکردهای مولکولی (MF)

شکل ۲: نمودار مسیرهای پیام‌رسانی KEGG آنالیز شده توسط DAVID نشان‌دهنده این است. رنگ سبز مسیرهای معنادار در مقایسه S3 با کنترل، رنگ زرد S5 نسبت به S3 و رنگ قرمز S5 نسبت به کنترل را نشان می‌دهد. محور xها enrichment ratio را نشان می‌دهد که نسبت تعداد پروتئین‌های مشاهده شده به کل پروتئین‌های مسیر است. محور yها نشان‌دهنده p-value هر مسیر می‌باشد. مسیر پیام‌رسانی cAMP که دارای تغییرات معنادار و بین این سه حالت مشترک است برای ادامه مطالعات برگزیده شد.

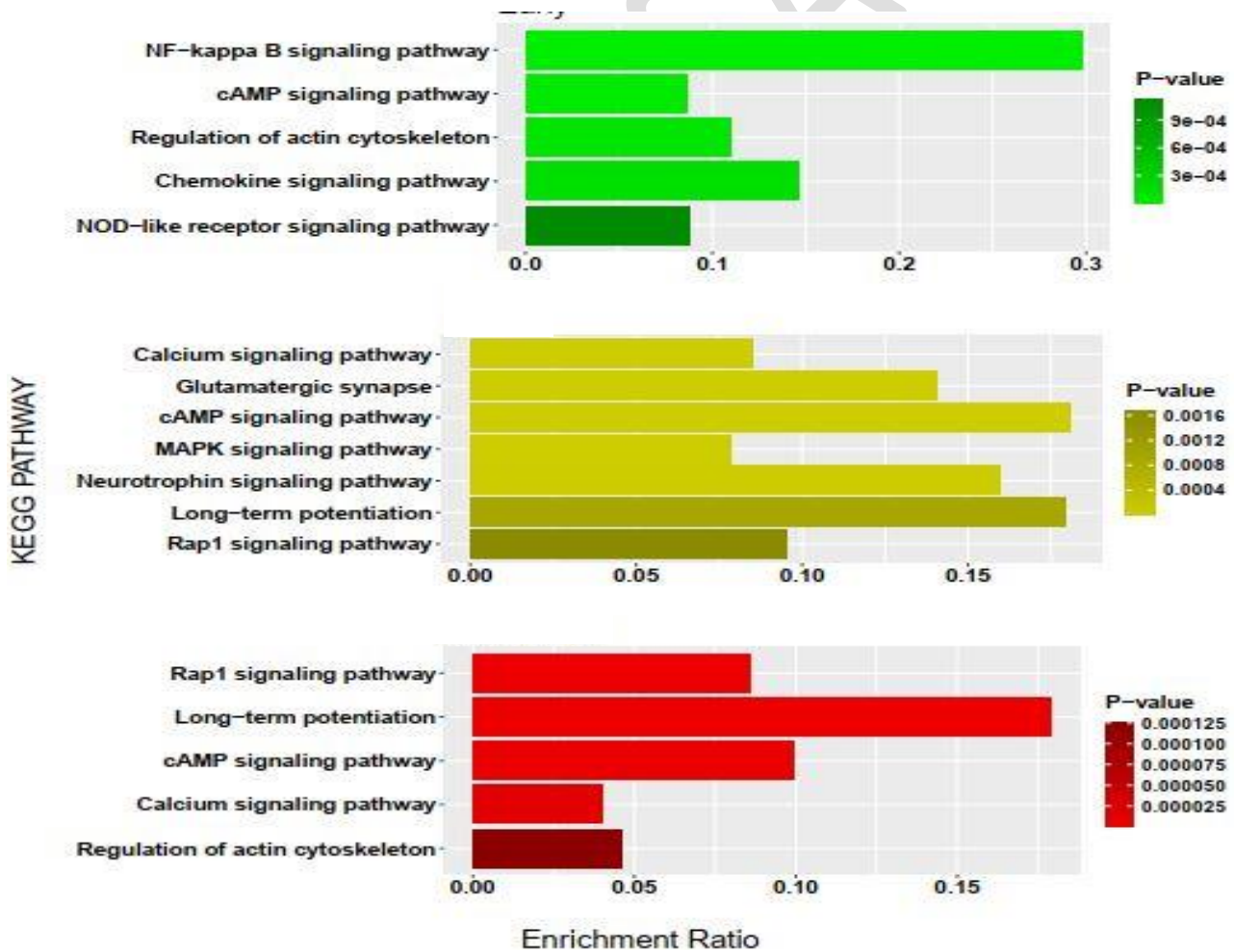
شکل ۳: نمودار Venn از پروتئین‌های درگیر مسیر پیام‌رسانی cAMP با تغییرات بیان معنادار که در مراحل مختلف کیندلینگ الکتریکی توسط تکنیک شاتگان پروتئومیکس شناسایی شدند. نمودار آبی تغییرات پروتئینی گروه مرحله ۵ (S5) نسبت به گروه کنترل، نمودار قرمز تغییرات گروه مرحله ۳ (S3) نسبت به گروه کنترل و نمودار سبز تغییرات گروه S5 نسبت به گروه S3 را نشان می‌دهند.

شکل ۴: بیان پروتئین‌های معنادار مشترک بین سه مرحله (مشاهده شده در Venn) که شامل سوماتواستاتین (SST)، گیرنده AMPA زیرواحد (Gria1) و آنزیم فسفولیپاز D2 (PLD2) است.

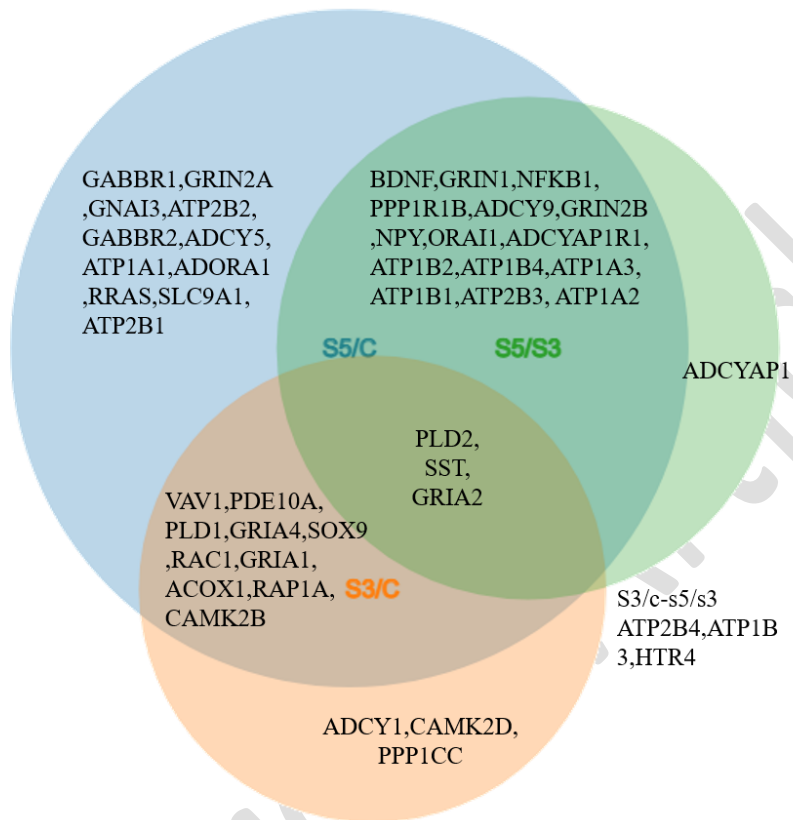




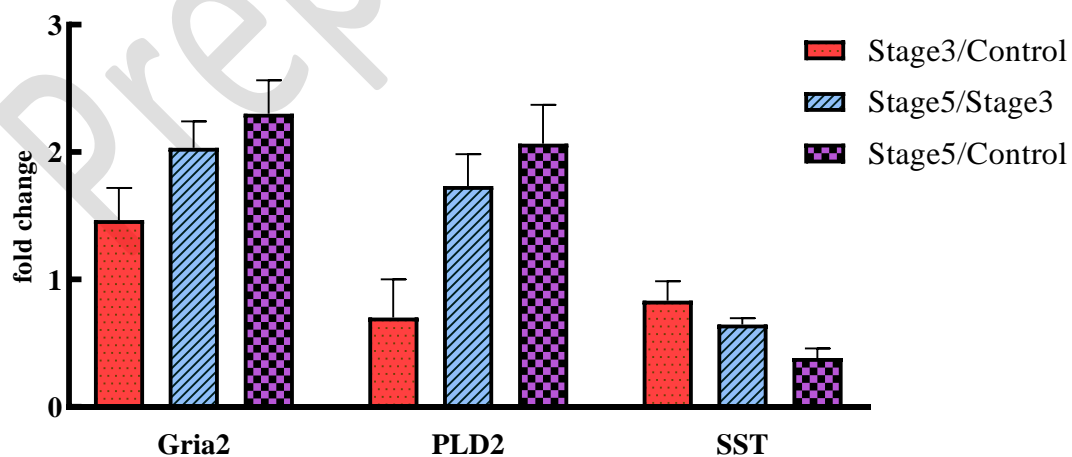
شکل ۱



شکل ۲



شکل ۳



شکل ۴

منابع

1. Avoli, Massimo, Jacques Louvel, René Pumain, and Rüdiger Köhling. 2005. "Cellular and Molecular Mechanisms of Epilepsy in the Human Brain." *Progress in Neurobiology* 77 (3): 166–200.
2. Barr, M.L., Kiernan, J.A., 1993. The Human Nervous System, United States of America. *Chapter 18*. n.d.
3. Boulton, Caroline L., Cathy R. McCrohan, and Celestine T. O'Shaughnessy. 1993. "Cyclic AMP Analogues Increase Excitability and Enhance Epileptiform Activity in Rat Neocortex in Vitro." *European Journal of Pharmacology* 236 (1): 131–36.
4. Cockcroft, S. 2001. "Signalling Roles of Mammalian Phospholipase D1 and D2." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58 (11): 1674–87.
5. Colley, William C., Tsung-Chang Sung, Richard Roll, John Jenco, Scott M. Hammond, Yelena Altschuler, Dafna Bar-Sagi, Andrew J. Morris, and Michael A. Frohman. 1997. "Phospholipase D2, a Distinct Phospholipase D Isoform with Novel Regulatory Properties That Provokes Cytoskeletal Reorganization." *Current Biology* 7 (3): 191–201.
6. Cooper, Dermot MF, Nicole Mons, and Jeffrey W. Karpen. 1995. "Adenylyl Cyclases and the Interaction between Calcium and cAMP Signalling." *Nature* 374 (6521): 421–24.
7. Esteban, José A., Song-Hai Shi, Christopher Wilson, Mutsuo Nuriya, Richard L. Huganir, and Roberto Malinow. 2003. "PKA Phosphorylation of AMPA Receptor Subunits Controls Synaptic Trafficking Underlying Plasticity." *Nature Neuroscience* 6 (2): 136–43.
8. Ferrendelli, James A., Ann C. Blank, and Robert A. Gross. 1980. "Relationships between Seizure Activity and Cyclic Nucleotide Levels in Brain." *Brain Research* 200 (1): 93–103.
9. Fisher, Robert S., Walter van Emde Boas, Warren Blume, Christian Elger, Pierre Genton, Phillip Lee, and Jerome Engel. 2005. "Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)." *Epilepsia* 46 (4): 470–72.
10. Grigoriev, V. V., L. N. Petrova, A. V. Gabrelian, V. L. Zamoyski, T. P. Serkova, and S. O. Bachurin. 2012. "Effect of Somatostatin on Presynaptic and Postsynaptic Glutamate Receptors and Postsynaptic GABA Receptors in the Neurons of Rat Brain." *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 154 (1): 10–12.
11. Isackson, Paul J., Molly M. Huntsman, Karl D. Murray, and Christine M. Gall. 1991. "BDNF mRNA Expression Is Increased in Adult Rat Forebrain after Limbic Seizures: Temporal Patterns of Induction Distinct from NGF." *Neuron* 6 (6): 937–48.
12. Kanehisa, Minoru, Miho Furumichi, Mao Tanabe, Yoko Sato, and Kanae Morishima. 2017. "KEGG: New Perspectives on Genomes, Pathways, Diseases and Drugs." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D353–61.
13. Khodaverdian, Shima, Elahe Dashtban-Moghadam, Bahareh Dabirmanesh, Javad Mirnajafi-Zadeh, Mohammad Taleb, Khosro Khajeh, and Yaghoob Fathollahi. 2021. "CD38 and MGLuR1 as Possible Signaling Molecules Involved in Epileptogenesis: A Potential Role for NAD⁺ Homeostasis." *Brain Research* 1765: 147509.
14. Kim, Seong Yun, Do Sik Min, Jeong-Sun Choi, Yun Sik Choi, Hyun-Jung Park, Ki-Wug Sung, Joonmo Kim, and Mun-Yong Lee. 2004. "Differential Expression of Phospholipase D Isozymes in the Hippocampus Following Kainic Acid-Induced Seizures." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 63 (8): 812–20.
15. Kokaia, Merab, Patrik Ernfors, Zaal Kokaia, Eskil Elmér, Rudolf Jaenisch, and Olle Lindvall. 1995. "Suppressed Epileptogenesis in BDNF Mutant Mice." *Experimental Neurology* 133 (2): 215–24.
16. Kwan, Patrick, and Martin J. Brodie. 2000. "Early Identification of Refractory Epilepsy." *New England Journal of Medicine* 342 (5): 314–19.
17. Lazarevic, Vesna, Santosh Pothula, Maria Andres-Alonso, and Anna Fejtova. 2013. "Molecular Mechanisms Driving Homeostatic Plasticity of Neurotransmitter Release." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 244.
18. M Hofer, A. 2012. "Interactions between Calcium and cAMP Signaling." *Current Medicinal Chemistry* 19 (34): 5768–73.

19. McAlister, Graeme C., Edward L. Huttlin, Wilhelm Haas, Lily Ting, Mark P. Jedrychowski, John C. Rogers, Karsten Kuhn, Ian Pike, Robert A. Grothe, and Justin D. Blethrow. 2012. "Increasing the Multiplexing Capacity of TMTs Using Reporter Ion Isotopologues with Isobaric Masses." *Analytical Chemistry* 84 (17): 7469–78.
20. Mertz, Christoffer, Sara Krarup, Cecilie D. Jensen, Sandy EH Lindholm, Christina Kjær, Lars H. Pinborg, and Lasse K. Bak. 2020. "Aspects of CAMP Signaling in Epileptogenesis and Seizures and Its Potential as Drug Target." *Neurochemical Research* 45 (6): 1247–55.
21. Mi, Huaiyu, Xiaosong Huang, Anushya Muruganujan, Haiming Tang, Caitlin Mills, Diane Kang, and Paul D. Thomas. 2017. "PANTHER Version 11: Expanded Annotation Data from Gene Ontology and Reactome Pathways, and Data Analysis Tool Enhancements." *Nucleic Acids Research* 45 (D1): D183–89.
22. Ogata, Hiroyuki, Susumu Goto, Kazushige Sato, Wataru Fujibuchi, Hidemasa Bono, and Minoru Kanehisa. 1999. "KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes." *Nucleic Acids Research* 27 (1): 29–34.
23. Onozuka, Minoru, Kenichi Kishii, Hiroyasu Furuichi, and Eiichi Sugaya. 1983. "Behavior of Intracellular Cyclic Nucleotide and Calcium in Pentylentetrazole-Induced Bursting Activity in Snail Neurons." *Brain Research* 269 (2): 277–86.
24. Pittaluga, Anna, Alessandra Roggeri, Giulia Vallarino, and Guendalina Olivero. 2021. "Somatostatin, a Presynaptic Modulator of Glutamatergic Signal in the Central Nervous System." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5864.
25. Purpura, Dominick P., and Robert J. Shofer. 1972. "Excitatory Action of Dibutyl Cyclic Adenosine Monophosphate on Immature Cerebral Cortex." *Brain Research*.
26. Racine, Ronald J. 1972. "Modification of Seizure Activity by Electrical Stimulation: II. Motor Seizure." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 32 (3): 281–94.
27. Reichlin, Seymour. 1983. "Somatostatin." *New England Journal of Medicine* 309 (24): 1495–1501.
28. Rogawski, Michael A. 2011. "Revisiting AMPA Receptors as an Antiepileptic Drug Target: Revisiting AMPA Receptors as an Antiepileptic Drug Target." *Epilepsy Currents* 11 (2): 56–63.
29. Rosenberg, Evan C., Pabitra H. Patra, and Benjamin J. Whalley. 2017. "Therapeutic Effects of Cannabinoids in Animal Models of Seizures, Epilepsy, Epileptogenesis, and Epilepsy-Related Neuroprotection." *Epilepsy & Behavior* 70: 319–27.
30. Sadeghi, Leila, Albert Anatolyevich Rizvanov, Bahareh Dabirmanesh, Inur Ildusovich Salafutdinov, Mohammad Sayyah, Amir Shojaei, Javad Zahiri, Javad Mirnajafi-Zadeh, Babak Khorsand, and Khosro Khajeh. 2021. "Proteomic Profiling of the Rat Hippocampus from the Kindling and Pilocarpine Models of Epilepsy: Potential Targets in Calcium Regulatory Network." *Scientific Reports* 11 (1): 1–12.
31. Sadeghi, Leila, Albert Anatolyevich Rizvanov, Inur Ildusovich Salafutdinov, Bahareh Dabirmanesh, Mohammad Sayyah, Yaghoob Fathollahi, and Khosro Khajeh. 2017. "Hippocampal Asymmetry: Differences in the Left and Right Hippocampus Proteome in the Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy." *Journal of Proteomics* 154: 22–29.
32. Seven, Mehmet, Bahadır Batar, Selin Unal, Gozde Yesil, Adnan Yuksel, and Mehmet Guven. 2014. "The Effect of Genetic Polymorphisms of Cytochrome P450 CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 on Drug-Resistant Epilepsy in Turkish Children." *Molecular Diagnosis & Therapy* 18 (2): 229–36.
33. Shahpari, Marzieh, Javad Mirnajafi-Zadeh, Seyed Mohammad P. Firoozabadi, and Ali Yadollahpour. 2012. "Effect of Low-Frequency Electrical Stimulation Parameters on Its Anticonvulsant Action during Rapid Perforant Path Kindling in Rat." *Epilepsy Research* 99 (1–2): 69–77.
34. Shao, Xuesi M., Qing Ge, and Jack L. Feldman. 2003. "Modulation of AMPA Receptors by CAMP-Dependent Protein Kinase in PreBötzing Complex Inspiratory Neurons Regulates Respiratory Rhythm in the Rat." *The Journal of Physiology* 547 (2): 543–53.
35. Sherman, Brad T., Qina Tan, Yongjian Guo, Stephan Bour, David Liu, Robert Stephens, Michael W. Baseler, H. Clifford Lane, and Richard A. Lempicki. 2007. "DAVID Knowledgebase: A Gene-Centered Database Integrating Heterogeneous Gene Annotation Resources to Facilitate High-Throughput Gene Functional Analysis." *BMC Bioinformatics* 8 (1): 1–11.

36. Smith P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B. J. Olson, D.C. Klenk, 1985. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry*, 150(1): 76–85.
37. Tallent, Melanie K., and George R. Siggins. 1997. "Somatostatin Depresses Excitatory but Not Inhibitory Neurotransmission in Rat CA1 Hippocampus." *Journal of Neurophysiology* 78 (6): 3008–18.
38. Vespignani, H., M. de Zélicourt, C. Laurendeau, F. Fagnani, L. Levy-Bachelot, C. Murat, P. Kahane, and B. de Toffol. 2014. "Adult Patients Treated for Focal Epilepsy with Antiepileptic Drugs (AEDs) in Combination in France: Description According to the 2009 ILAE Definition of AED Resistance (ESPERA Study)." *Revue Neurologique* 170 (2): 100–109.
39. Wang, Guangming, Zhanpeng Zhu, Dahai Xu, and Lichao Sun. 2020. "Advances in Understanding CREB Signaling-Mediated Regulation of the Pathogenesis and Progression of Epilepsy." *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 106018.
40. Wasterlain, Claude G., and Eva Csiszar. 1980. "Cyclic Nucleotide Metabolism in Mouse Brain during Seizures Induced by Bicuculline or Dibutyryl Cyclic Guanosine Monophosphate." *Experimental Neurology* 70 (2): 260–68.
41. Wong, Scott T., Jaime Athos, Xavier A. Figueroa, Victor V. Pineda, Michele L. Schaefer, Charles C. Chavkin, Louis J. Muglia, and Daniel R. Storm. 1999. "Calcium-Stimulated Adenylyl Cyclase Activity Is Critical for Hippocampus-Dependent Long-Term Memory and Late Phase LTP." *Neuron* 23 (4): 787–98.
42. Zhu, Xinjian, Xiao Han, Julie A. Blendy, and Brenda E. Porter. 2012. "Decreased CREB Levels Suppress Epilepsy." *Neurobiology of Disease* 45 (1): 253–63.

An analysis of epileptogenesis-related proteins involved in cAMP signaling

Elahe Dashtban-Moghadam¹, Shima Khodaverdian¹, Bahareh Dabirmanesh¹, Javad Mirnajafi-Zadeh^{2,3}, Yaghoub Fatholahi^{*2}, Khosro Khajeh^{*1}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Department of Medical Physiology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Institute for Brain and Cognition, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Epilepsy is a chronic neurological disorder that lacks an effective treatment, and most patients do not respond to existing medications. Due to the lack of a molecular mechanism of epilepsy and the incomplete understanding of proteins that are involved that epilepsy is largely unknown. Therefore, it is important to identify and control the epileptic process so that relevant and effective drug treatments can be administered. This study used the electrical kindling method and the proteomics shotgun technique to analyze the proteomes of rats during epileptogenesis. The analysis of system biology data determined that the cAMP signaling pathway is involved in epilepsy, as well as changes in the expression of proteins that are upstream and downstream of this secondary messenger in the stages of electrical kindling was observed. There was a significant decrease in expression of somatostatin neuropeptide from upstream proteins and an increase in expression of phospholipase D2 and AMPA glutamate receptor type 2 from downstream proteins during epilepsy. Taking advantage of these data, we can consider a new method to identify the mechanism of epilepsy and introduce new drug targets by identifying changes in the expression of cAMP signaling pathway proteins and their roles in the epilepsy process.

Keywords: epileptogenesis, electrical kindling, hippocampus, shotgun proteomics