به کارگیری آمار غیر خطی (آنالیز مولفه اصلی) در آنالیز داده های تمایز سلول بنیادی به آستروسیت

حکیمه زالی[1]، مصطفی رضایی طاویرانی[2*]، علی صید خانی نهال[3] ، شیما مرادی[4]

1)دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
2)مرکز تحقیقات پروتئومیکس ، دانشکده پیراپزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
3)گروه بیوشیمی دانشکده پیراپزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
4)گروه میکروبشناسی ،دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: **تاریخ پذیرش:**

چکیده

مقدمه: ترکیب آمار تک متغیره و چند متغیره می تواند به شناسایی تغییرات بیولوژیکی واقعی معنی دار در بیان پروتئین ها بین گروههای آزمایشی مختلف کمک نماید. یکی از معمولی ترین روش های آماری که کمک بسیاری به آنالیز ژل های الکتروفورز دو بعدی می کند آنالیز مولفه اصلی(Principal components analysis(PCA)) است. در این مطالعه فرآیند تمایز سلول های بنیادی به آستروسیت ها مورد بررسی پروتئومیکی قرار گرفت و پروتئوم دو نوع سلول توسط نرم افزار آماری مورد آنالیز مولفه اصلی قرار گرفت .

مواد و روش ها: آسپیره مغز استخوان از دهنده سالم ، تهیه شد و جداسازی مونونوکلوئر سل انجام شد . سلول ها در 10درصد DMEM با گلوکز پایین ، گلوتامین ، استرپتومایسین و پنی سیلین در شرایط CO2 5 درصد و رطوبت 98 درصد در دمای 37 ^{o}c انکوبه شدند. برای تمایز این سلول های بنیادی به سلول های آستروسیتی ، سلول ها در مجاورت رتینوئیک اسید ، cAMP، PGF، PDGF، NGFقرار گرفت. از دو رده سلولی سلول های بنیادی وسلول های آستروسیت پروتئین استخراج شد و جداسازی پروتئین ها با الکتروفورز دو بعدی صورت گرفت . به روش رنگ آمیزی نیترات نقره ژل ها رنگ شدند و ژل های اسکن شده با روش های بیو انفورماتیکی و نرم افزار های آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت.

یافته های پژوهش: آنالیز بیوانفورتیکی و آماری ژل های بدست آمده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی 774 نقطه پروتئینی در دو گروه مشاهده شد که مقایسه بین گروه ها حکایت از بیان پروتئینهای جدید و خاموشی برخی از پروتئین ها در مسیر های سیگنالینگ تمایز سلولی است . آنالیز خوشه بندی پروتئین ها را از نظر بیان به 3 خوشه اصلی تقسیم نمود که بیانگر وجود پروتئین هایی با بیان مشابه در هر خوشه است که این پروتئین ها می توانند عملکرد مشابهی را در شرایط آزمایش ارائه نمایند یا بیانگر حضور همه آن ها در مسیر بیولوژیکی مشترکی است . آنالیز PCA نتایج حاصل از خوشه بندی را تایید نمود و نشان داد که داده پروتئینی بر طبق شرایط آزمایش خوشه‌بندی شده است. در نهایت می توان نتیجه گرفت که تمایز باعث تغییر بیان معنی داری در سطح پروتئوم می شود که این تغییرات را می توان با آنالیزهای آماری خوشه بندی و PCA به خوبی مورد بررسی قرار دادو شاخص های تغییرات را مشخص نمود.

واژه های کلیدی:پروتئومیک، آنالیز اجزا اصلی، آستروسیت

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

مقدمه

تجزیه و تحلیلهای پروتئومیکس امروزه به عنوان یکی از روش های مهم در مطالعات بیان ژن و ژنومیکس عملکردی محسوب می شوند. استفاده از این روش ها به چند دلیل ضرورت دارند. امروزه مشخص شده است که بین سطح m-RNA و پروتئین ها و حتی گاهی توالی آنها رابطه دقیقی بر قرار نیست. توالی های DNA و RNA اطلاعات بسیار کمی را در مورد جایگاه پروتئین‌ها،تغییرات پس از ترجمه و نیمه عمر پروتئین ها به ما می دهند. از طرفی با استفاده از روشهای پروتئومیکس تعداد زیادی ازپروتئین ها را می توان هم زمان (صدها حتی هزاران پروتئین) در یک ترکیب پیچیده ای مانند محتویات یک سلول لیز شده مورد بررسی قرار داد . با توجه به تعداد بیشتر متغیرها نسبت به تعداد نمونه ها در داده های پروتئومیکی استفاده از روش های آماری چند متغیره جهت آنالیز و مقایسه تغییرات بیان پروتئین ها در نمونه ها ضروری به نظر می رسد. یکی از روش های آنالیز برای این نوع از داد ه ها استفاده از آنالیز اجزا اصلی (PCA) است که هدف آن کاهش حجم داده ها و تعبیر و تفسیر راحت تر آن ها می باشد. PCA یک تکنیک مفید آماری است که کاربرد آن در زمینه های از قبیل تشخیص چهره، فشرده سازی تصویر و یک تکنیک رایج برای شناسایی یک الگو در داده هایی از بعد بالا است(1و2). این تبدیل که با اسامی دیگری چون تبدیل هتلینگ(Hostelling Transform)، تبدیل کارهانن-لو((Karhunen-Live Transform(KLT) و بردار های ویژه نیز شناخته می شود،تبدیل بهینه در کارهای فشرده سازی و کاهش بعد است و خطای میانگین مربعات حاصل از فشرده سازی را کمینه می کند. هر چند این تبدیل به علت وابسته بودن به داده ورودی، جای خود را در الگوریتم های کاربردی و عملی، به تبدیل گسسته کسینوسی(Discret Cosine Transform(DCT)) داده است اما در صورت کافی بودن داده ورودی ، می تواند تبدیل بهینه را استخراج نماید(1-5).

سلول هایی بنیادی، سلول های تخصص نیافته هستند و به مدت های طولانی از طریق تقسیم سلولی خود را نوسازی می کنند تحت شرایط تحریک فیزیولوژیکی یا آزمایشی، تبدیل به سلول هایی با عملکردهایی ویژه می شوند.رسیدن سیگنال تمایز به سلول بنیادی باعث می شود بعضی از ژنهایش را روشن کند و پروتئنهای جدیدی را بسازد که این پروتئنها کمک می کند که سلول بنیادی مشابه به سلول تمایز یافته شود. بنابراین تغییرات شدیدی در سطح بیان ژن منجر به این تبدیل می شود که منجر به خاموشی یا روشن شدن مسیرهای سیگنالینگ متعددی در سلول می شود که همه این اتفاقات در سطح پروتئوم قابل ردیابی و آشکارسازی است . با توجه به ماهیت داده های پروتئومیکی که دارای متغیرهای متعددی است استفاده از روش آنالیز مولفه اصلی که می تواند همزمان همه نقاط پروتئینی موجود را مورد بررسی قرار دهد و تفاوت های کلی بیان ژن را بین گروه های مختلف درگیر در آنالیز را شناسایی نماید روش موثری است .از طرفی برای انجام آن به سادگی می توان از نرم افزارهای آماده موجود در بازار نیز استفاده نمود(6-10). در این مطالعه فرآیند تمایز سلول های بنیادی به آستروسیت ها توسط پروتئومیکس مورد بررسی قرار داده و نتایج حاصله که شامل پروتئوم دو نوع سلول است توسط نرم افزار آماری مورد آنالیز مولفه اصلی قرار می گیرد تا بتواند به عنوان یکی از بهترین روش های آماری اختلاف و شباهت دو سلول را در سطح پروتئوم بیان نماید.

مواد و روش ها

نمونه گیری:

آسپیره مغز استخوان از دهنده سالم ، تهیه شد و به دنبال آن ، جداسازی مونونوکلوئر سل ها (سلول های تک هسته ای) با استفاده از ستون فایکول با دانسیته 1.077 انجام گرفت . مونونوکلوئر سل ها به فلاسک های حاوی DMEM 10 درصد با گلوکز پایین ، گلوتامین ، استرپتومایسین و پنی سیلین انتقال یافت . انکوباسیون سلول ها در شرایط CO_2 5 درصد و رطوبت 98 درصد در دمای 37^oc انجام شد (11) .

اولین پاساژ سلول بنیادی پس از 4 روز با تریپسین 0.25درصد و EDTA 0.5 درصد صورت گرفت در مرحله بعد برای تمایز این سلول ها به سلول های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

آستروسیتی ، سلول های کشت داده شده در مجاورت رتینوئیک اسید ، cAMP ، PGF، PDGF، NGF قرار گرفت .

استخراج پروتئین:

از دو رده سلولی تمایز نیافته (سلول های بنیادی)وسلول های تمایز یافته (سلول های آستروسیت) پروتئین استخراج شد بدین ترتیب که ابتدا فلاسک های حاوی سلول را با PBS دوبار شستشو داده سپس سلول ها را با کمک تریپسین جدا نموده و به آن ها بافر سرد تریس 20 میلی مولار با pH=7/5 اضافه می شود. این بافر حاوی 2میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استات1، 1میلی مولار فنیل متیل سول فونیل فلوراید2، 32/ مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتئازها شامل (10میلی مولار N - اتیل مالمید، 2میلی مولار ایدواستات، 25 میلی مولار بنز آمیدین، 12/5 میلی مولار 6-آمینوکاپروئیک اسید)اضافه می شود. سلولها در درجه حرارت پائین بکمک دستگاه هموژنیزر همگون می گردد. مخلوط هموژنیزه شده بمدت 10 دقیقه در دمای 10 درجه سانتیگراد در g 1000 سانتریفیوژ شد . مایع روئی حاصله با استفاده از سانتریفیوژ دور بالا بمدت 30 دقیقه در 40000g در 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژمی شود.

رسوب حاصل از سانتریفیوژ در حجم یک میلی لیتر بافر استخراج یکنواخت می شود. وسپس دوباره در 40000g بمدت 30 دقیقه در 4 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ می گردد. رسوب حاصل در 400 میکرولیتر بافر اولیه و 100 میکرولیتر بافر نمونه (5x) بتدریج و با تکان دادن حل می گردد. پس از انجام سانتریفیوژ و تهیه رسوب پروتئینی، غلظت پروتئینهای دو گروه آزمایشی به روش برادفورد (12)مورد سنجش قرار گرفت.

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول ، IEF (Iso Electric Focusing) ،از نوارهای ژلی IPG (Imobilized PH Gradiant)در رنج PH 3 تا 10استفاده شد و پروتئین ها درون دستگاه IPG بسته به PH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند.

بعد دوم شامل ژل پلی آکریل آمید با غلظت 12 درصد حاوی 15 میلی لیتر از محلول ذخیره 30 درصد (اکریل آمید به علاوه بیس آکریل آمید با نسبت 29/2 درصد به 0/8 درصد)، 18/76 میلی لیتر آب دی‌یونیزه و 11/25 میلی لیتر بافر تریس و همراه 30 میکرولیتر TEMED و 30 میکرولیتر آمونیم پرسولفات است . بافر الکتروفورز (Running buffer) به تانک های بالا و پائین افزوده می‌شود. این بافر شامل 0/025 مولار تریس- اسید کلرئیدریک (یا باز)، 0/192 مولار گلایسین و 0/1 درصد SDS می‌باشد. در نهایت پس از برقراری جریان، الکتروفورز در جریان ثابت 30 الی 40 میلی آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک شده در دمای 9 درجه سانتیگراد انجام گردید. رنگ آمیزی پروتئین ها به روش رنگ آمیزی نیترات نقره انجام شد و ژل ها اسکن و تصاویر پردازش شد و در نهایت با روش های بیو انفورماتیکی و نرم افزار های آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت(13).

آنالیز تصویر ژل‌های دوبعدی

الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی پپتید را از یک محلول پروتیئنی بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی آنها جدا کند. پس از طی مراحل رنگ‌آمیزی، پروتئین‌ها بصورت لکه‌هایی با صفات و ویژگی‌های ظاهری متفاوت مانند شکل، اندازه و شدت رنگ نمایان می‌گردند. پس از اسکن ژل ، استخراج داده‌های مربوط به دو گروه با نرم افزار Progenesis Same Spot Non Linear مورد بررسی قرار گرفت. تعداد نقاط پروتئینی و تفاوت آن ها (افزایش و یا کاهش بیان) توسط این نرم افزار آنالیز شد و با آمار چند متغیره(آنالیزمولفه اصلی) پروتئین ها از نظر بیان خوشه بندی شدند .

یافته های پژوهش

نرم افزار های آنالیز ژل های الکتروفورز دو بعدی با بهره گیری از روش های تشخیص الگو و با کمک روش های آمار تک متغیره و چند متغیره به دنبال شناسایی نقاط و تطابق آن ها در ژل های مختلف گروه های تحت آنالیز هستند تا تفاوت پروتئومیکی بین حالت های سالم و بیماری یا مراحل مختلف یک

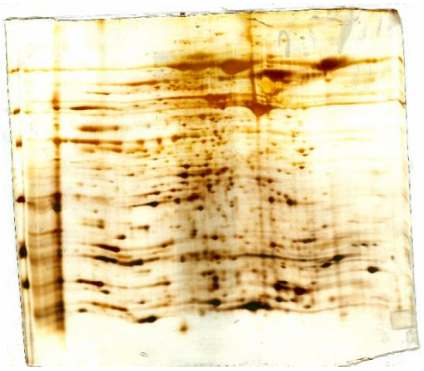
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

بیماری و حالت های تحت انکوباسیون با دارو و کنترل آن را شناسایی نمایند و پروتئین های مارکر را که می توانند نقش تشخیصی یا هدف های دارویی باشند در گروه های مورد مقایسه کشف نماید. در این مطالعه از نرم افزار Non Linear Progenesis Same Spot جهت آنالیز آماری دو گروه سلول بنیادی و آستروسیت استفاده شد.

در شکل 1 ، تصویر ژل الکتروفورز دو بعدی از سلول های بنیادی (الف) و آستروسیت (ب)را نشان می دهد. آنالیز ژل ها با کمک نرم افزارProgenesis 774 نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان و تعدادی دارای کاهش بیان بودند . جایگاه نقاط در ژل مرجع در شکل 2 نشان داده شده است .

این نرم افزار خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد ، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه ، دارای بیان مشابهی باشند ؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در سلول مورد نظر دارند (با هم ، افزایش و یا کاهش می یابند)که نتایج حاصل از این آنالیز خوشه بندی ، در شکل 3 مشاهده می نماید .حاصل این آنالیز سه خوشه اصلی پروتئینی می باشد.

شکل 4 آنالیز PCA دو بعدی را در دو نمونه مورد آزمایش نشان می دهد که این آنالیز دقیقا منطبق بر انتخاب داده هایی است که در خوشه بندی شکل 3 صورت گرفته است در حالی که آنالیز PCA در شکل 5 آنالیز هر خوشه پروتئینی در دو گروه را نشان می دهد. شکل 5-الف میزان بیان بالاتر در سلول های بنیادی نسبت به آستروسیت است در حالی که در 5-ب میزان بیان بالاتر در سلول های آستروسیت نسبت به بنیادی را نشان می دهد.

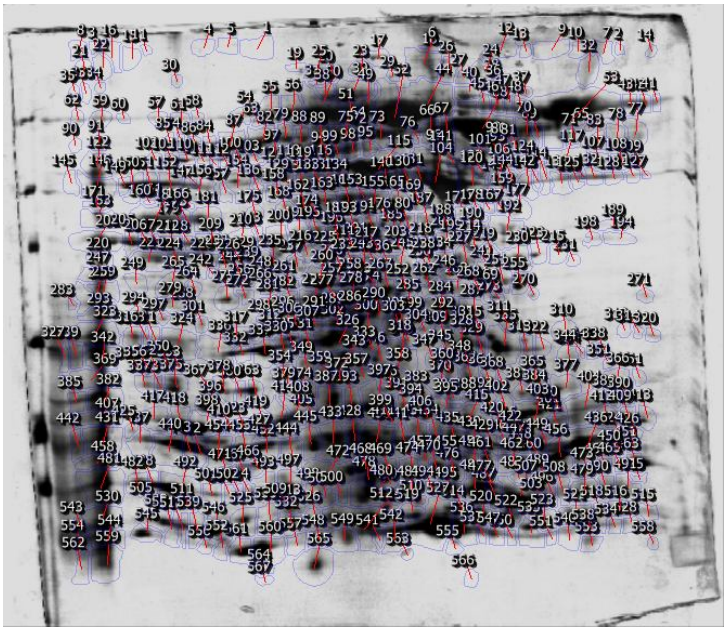


(الف)

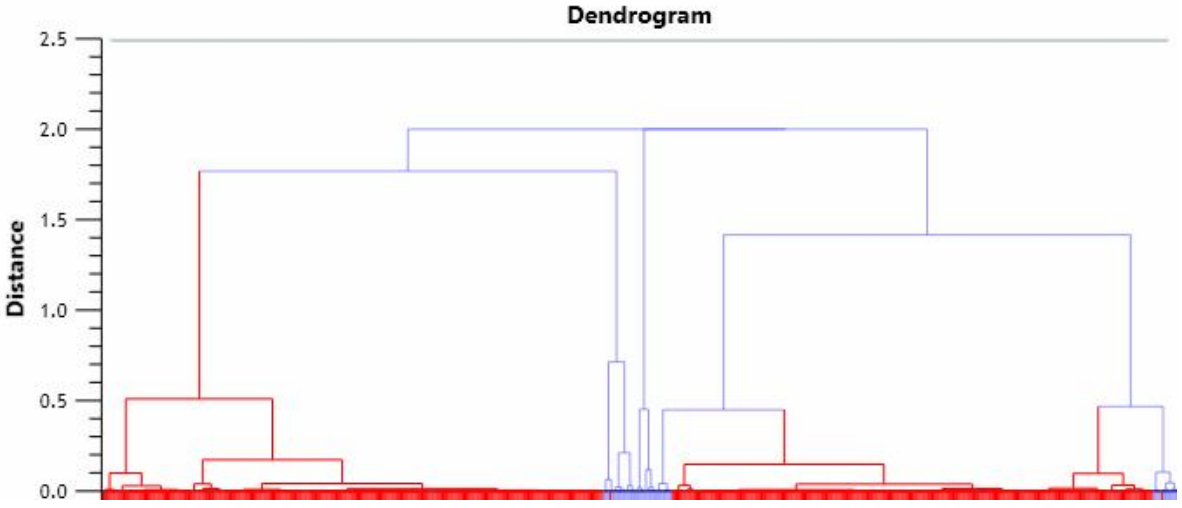
(ب)

شکل 1: شکل ظاهری ژل های دو بعدی برای سلول های بنیادی(الف) وآستروسیت مشتق ازآن (ب)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

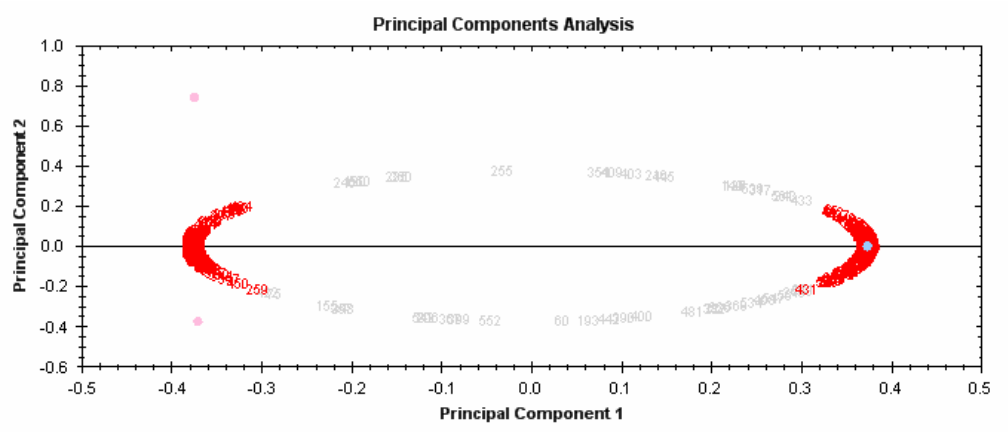


شکل 2: شکل ژل دو بعدی مرجع آنالیز شده توسط نرم افزار Progenesis

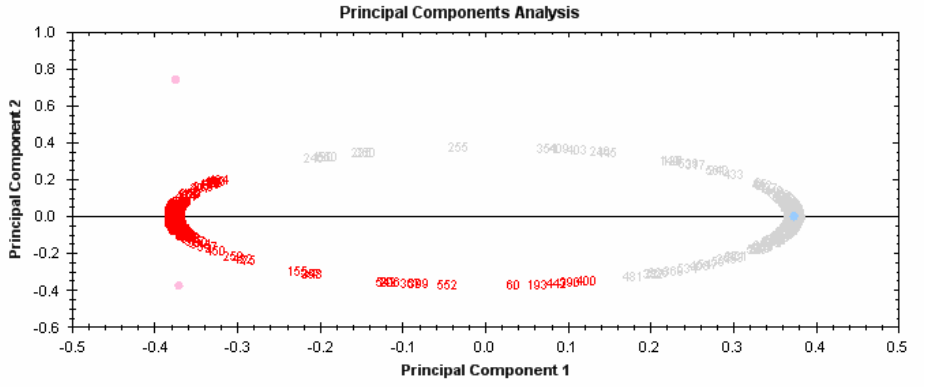


شکل 3: خوشه بندی پروتئین های به دست آمده توسط نرم افزار Progenesis

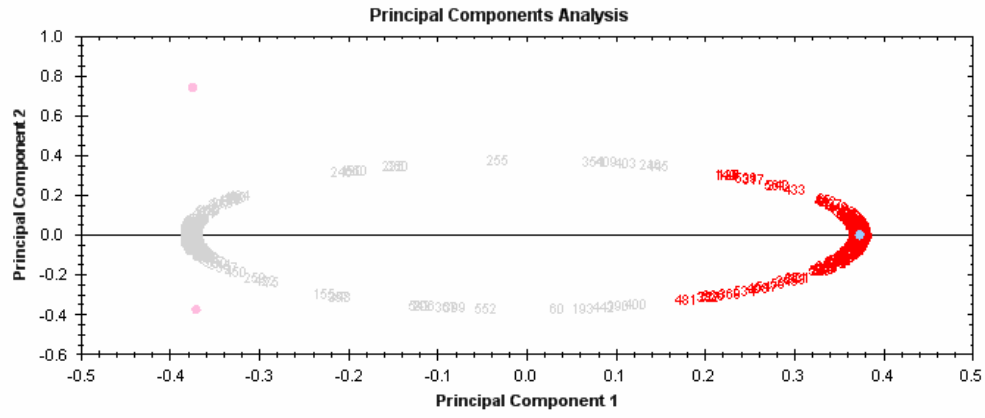
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]



شکل 4: آنالیز PCA خوشه های پروتئینی انتخاب شده در شکل 3



الف



ب

شکل 5 – آنالیز PCA تفاوت خوشه پروتئینی در دو گروه: میزان بیان بالاتر در سلول های بنیادی نسبت به آستروسیت (الف) و میزان بیان بالاتر در سلول های آستروسیت نسبت به بنیادی (ب) را نشان می دهد

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

بحث و نتیجه گیری

آستروسیت ها گروه هتروژنی ازانواع سلول های غیر عصبی هستند که دارای عملکردهای متنوعی هستند. در مهاجرت و تمایز سلول های بنیادی عصبی نقش دارند (7و8) . آستروسیت ها قادرند از سلول های بنیادی طی فرآیند تمایز تکامل یابند. در واقع ، تمایز فرآیندی است که در آن ، سلول های غیر تخصصی ، به سلول های تخصصی یک بافت خاص تبدیل می شوند و انواع مختلف آن شامل تمایز ریختی ، ساختاری ، سوخت و سازی و فیزیولوژیکی است (9). یکی از راه های بررسی تغییرات کلی حاصل طی این فرآیند مطالعه دو نوع سلول با روش های پروتئومیکی و سپس آنالیز های بیوانفورماتیکی است. پروتئومیک به مطالعه پروتئوم که در یک سلول و در یک زمان مشخص بیان می شود، می پردازد . تغییر ات بیان در سطح پروتئوم با کمک تکنیک ژل الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز پروتئومیکی قرار گرفت . شکل 1 ژل های دو گروه سلول بنیادی و آستروسیت را نشان می دهد .امروزه استفاده از نرم افزار های آنالیز ژل کمک بیوانفورماتیک را در ساده نمودن آنالیز داده های پروتئومیکی امری اجتناب ناپذیر نموده است. پیشرفت هایی که در سطح نرم افزاری صورت گرفته است آنالیز های آماری چند متغیره را در داده های چند بعدی پروتئومیکی تسهیل نموده است. در این مطالعه ژل های الکتروفورز دو بعدی با استفاده از نرم افزار progenesis same spot مورد آنالیز قرار گرفتند که نتایج یکی از آنالیز ها در شکل 2 نشان داده شده است . مقایسه دو گروه نشان دا د که 774 نقطه پروتئینی در دو گروه مشاهده شده است که مقایسه بین ژل های دو گروه در سطح بیان پروتینی حکایت از بیان نقاط پروتئینی جدید و خاموشی بیان برخی نقاط دیگر است. این نتیجه بیانگر این است که تمایز باعث تغییراتی وسیعی در سطح بیان ژنی می شود.

نرم افزار progenesis same spot با استفاده از روش آنالیز همبستگی ،خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد ، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی می باشند ؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در حالت سلولی مورد نظر دارند (با هم ، افزایش و یا کاهش می یابند). در شکل 3 آنالیز خوشه بندی ، پروتئین ها را از نظر بیان به 3 خوشه اصلی تقسیم نموده است . خوشه سمت چپ دسته پروتئینی را نشان می دهد که دارای بیان بیشتری در گروه سلول بنیادی نسبت به آستروسیت بوده اند و خوشه میانی به همان نسبت که سمت راست می رود این نسبت تغییر می یابد به طوری که در خوشه آخر در سمت راست تغییر بیان در آستروسیت بیشتر از سلول بنیادی است. خوشه بندی در این مطالعه بر اساس میزان بیان بود و نشان دهنده وجود پروتئین هایی است که می توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به هم داشته باشند ، به طوری که افزایش بیان همزمان چندین پروتئین باید در جبران کاهش بیان یا عدم بیان پروتئین های دیگر باشد. به طوری که تفاوت های بین دو حالت مختلف سلولی مانند پیری و جوانی یا سالم و بیمار و در نهایت سلول تحت انکوباسیون با یک دارو در مقابل کنترل آن بدون حضور دارو می توانند منجر به بروز مسیر سیگنالینگ ویژه ای در سلول شوند که در همراهی با بیان کمپلکس های پروتئینی آن مسیر شوند و به طور ناگهانی با ظهور پروتئین های جدیدی در سلول مواجه شویم. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نرم افزار به آنالیز ژل های دو بعدی پرداخته اند نیز نتایج مشابهی را نشان می دهند و بیان می کنند که پروفایل بیانی مشابه اعضای یک خوشه دارای تفسیر بیولوژیکی منطقی است (14-18).

آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی (PCA)برای تایید آنالیز خوشه بندی توسط نرم افزار انجام می شود که در شکل4 و 5 نشان داده شده است . آنالیز اجزا اصلی (PCA) یک تکنیک مفید آماری است که برای شناسایی یک نمونه در داده های از بعد بالا است .آنالیز اجزای اصلی یک روش اختیاری چند منغیری است. اگر ما در جایی مجبور هستیم مهم ترین متغیر را یا یک تعداد محدودی از متغیر ها را دریک مجموعه انتخاب کنیم از آنالیز اجزای اصلی کمک می گیریم . این روش یکی از الگوهای تشخیص و شناسایی (تشخیص هویت)در یک مجموعه اطلاعات است. در این روش اطلاعات را بر اساس شباهت ها و

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

تفاوت هایشان بیان می کنند. از آن جا که در اطلاعات از ابعاد بالا، نقشه و طرح خاصی را به سختی می توان در داده ها پیدا کرد در حقیقت آنالیز اجزای اصلی ارتباط بین داده ها را کشف می کند و در جایی که نعمت نمایش گرافیکی در دسترس نیست، آنالیز اجزای اصلی یک ابزار نیرومند برای آنالیز اطلاعات است. مزیت دیگر آن این است که کاهش تعداد ابعاد بدون از دست دادن مقدار زیادی از اطلاعات انجام می پذیرد و هدف اصلی خلاصه کردن داده ها است و به عنوان یک وسیله دسته کننده اطلاعات مورد توجه نیست(1-4).

PCA کاربردهای زیادی در داده های چند بعدی پروتئومیکی دارد. نتایج آنالیز PCA پراکندکی اعضا هر خوشه در اطراف یک بردار را نشان می دهدو بیانگر این است که نقاط نزدیک به یکدیگر متعلق به یک کلاس هستند که در پروتئومیکس تنوع را در بین مجموعه داده می تواند دسته بندی کند و اعضائ هر دسته را نیز مشخص نماید . از طرفی اگر گونه های متفاوتی از داده مورد استفاده قرار گیرد می تواند خوشه های هر گونه را نیز مشخص نماید و نشان دهد که همه نمونه های یک گونه در اطراف یک بردار واضح قرار می گیرند و همه خوشه ها به هم نزدیک هستند.در هر دو شکل 4 و 5 جایگاه پروتئین های هر دو گروه را نشان می دهد و بیانگر این است پروتئین هایی که متمایل به یک سمت هستند خوشه های مشترک زیادی با هم دارند . از طرفی PCA بیانگر این است که هیچ outlierی در داده وجود ندارد و داده بر طبق شرایط آزمایش خوشه‌بندی شده است. در مطالعه پروتئومیکی دیگری نیز از PCA جهت ارزیابی مجموعه داده استفاده شده بود همه نمونه های N.meningitidis به طور واضحی در اطراف یک بردار قرار گرفتند و نمونه های که توسط خوشه بندی به روش شبکه عصبی مصنوعی خوشه بندی نشده بودند و در کلاس ها قرار نگرفته بودند در فاصله ای از آنها که خوشه بندی شده بودند قرار گرفتند و نشان می داد که با توجه به ماهیت داده ها که از دو گونه متفاوت بوده استPCA می تواند خوشه های تشکیل شده از روش های مختلف خوشه بندی را مورد ارزیابی قرار دهد و outliers موجود در مجموعه داده را تعیین نماید(19).

از PCA سه بعدی در تصاویر الگوهای پروتئومیکی جهت شناسایی کلاس نمونه های موجود در یک مجموعه داده استفاده می شود. روش پیشرفته تری جهت دو مجموعه داده مختلف به کار گرفته شد. مجموعه داده ای متشکل از 5 نمونه از سرم موش سالم و 5 نمونه سرم موش هایی که نیکوتین دریافت کرده بودند. مجموعه داده دوم شامل داده های 4 نمونه غده لنفاوی سالم و 4 نمونه غده لنفاوی مبتلا به لنفومای غیر هوجکینی بود. با کمک این روش موفق به شناسایی کلاس های نمونه های موجود در هر دو گروه ژل دو بعدی شدند و اجازه داد تا نواحی از نقشه های دو بعدی مسئول تفاوت های موجود در بین کلاس ها برای هر دو مجموعه داده سرم موشی و لنفومای انسانی مورد شناسایی قرار گیرد(20).

به طور کلی می توان این نتیجه را گرفت تفاوت معنی داری بین دو گروه سلولی بنیادی و آستروسیت در فرآیند تمایز سلولی وجود دارد و این تغییرات در سطح ملکولی با کاهش و افزایش بیان پروتئین ها و حضور یا ناپدید شدن پروتئین ها خود را نشان می دهد. این تغییرات را در سطح ملکولی با آنالیزهای آماری چند متغییره ای نظیر کلاسترینگ یا آنالیز همبستگی و آنالیز مولفه اصلی به خوبی آشکار گردید و گروههای پروتئینی که دارای تغییر بیان بودند خود را به صورت خوشه های مجزایی نشان دادند که برای شناسایی مکانیسم ملکولی تمایز و تعیین مسیرهای بیولوژیک نیاز به مشخص شدن همه پروتئین های هر خوشه است که باید توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری جرمی تعیین هویت شوند.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی با کد -1-1391 96-8969 است که توسط کمیته پژوهشی دانشجویان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب گردیده است .از مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در اجرای پروژه همکاری داشتند تشکر می گردد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

References

1-Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. Comput Statist 2010;2: 433-59.
2-Jolliffe I.T. Principal Component Analysis. 2nd ed. Springer:NY; 2002. P.48-28.
3-Miranda AA, Le-Borgne YA, Bontempi G. New routes from minimal approximation error to principal components. Neural Processing Letters:Springer; 2008.
4-Urfer W, Grzegorczyk M, Jung K. study, a protocol on image acquisition has also been included. Proteomics 2006;6: 48-55.
5-Harrington BP, Vieira EN, Espinoza J, Nien JK, Romero R, Yergey AL. Analysis of variance–principal component analysis: A soft tool for proteomic discovery. Analytica Chimica Acta 2005; 544:118-27.
6-Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. Nature Genet 2003; 33: 311-23.
7- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. Nature 2002:417:29-32.
8- Stevens CF. Astrocytes trigger maturation of neural stem cells. Howard Hughes Med Inst News 2002:312:22-27.
9- Mckay R. Stem cell in the central nervous ystem. Science 1997:276: 66-71.
10-Bishop CM, Tipping M E. A hierarchical latent variable model for data visualization. IEEE 1998:20: 281–293.
11- Song H, Stevens C. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nature Neurosci 2002:5: 438-45.
12-Brad ford, MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the princil of protein. Analyt Biochem 1976:72: 248-54.
13-Zhou G, Hongmei L, Decamp D. 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. Mol Cell Proteomics 2002; 1: 117-23.
14-O'Gorman M, Beauvallet C. An investigation into Crohn's disease using the progenesis same spots analysis platform. Nonlinear Dynamics, Newcastle-upon-Tyne, UK, Institut National de Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France, Hopital Saint-Antoine, Paris, France.
15-Bedon F, Villar E, Vincent D, Dupuy JW, Lomenech AM, Mabialangoma A, et al. Proteomic plasticity of two Eucalyptus genotypes under contrasted water regimes in the field. Plant Cell Environ 2012;35:790-805.
16-Bièche C, de Lamballerie M, Chevret D, Federighi M, Tresse O. Dynamic proteome changes in Campylobacter jejuni 81-176 after high pressure shock and subsequent recovery. J Proteomics 20122;75:1144-56.
17-Brunelli L, Campagna R, Airoldi L, Cauli O, Llansola M, Boix J, et al. Exploratory investigation on nitro- and phospho-proteome cerebellum changes in hyperammonemia and hepatic encephalopathy rat models. Metab Brain Dis 2012;27:37-49.
18-Chan K, Casjens S, Parveen N. Detection of Established Virulence Genes and Plasmids To Differentiate Borrelia burgdorferi Strains. Infect Immun 2012;80:1519-29.
19-Lancashire L, Schmid O, Shah H, Ball G. Classification of bacterial species from proteomic data using combinatorial approaches incorporating artificial neural networks, cluster analysis and principal components analysis. Bioinformatics 2005; 21:2191-9.
20-Emilio Marengo et al. Application of Three-Way Principal Component Analysis to the Evaluation of Two-Dimensional Maps in Proteomics, J Proteome Res 2003;2 : 351-60.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]

Application of Non Linear Statistics (Principal Component Analysis) in Data Analysis of Differentiation Stem Cell to Astrocyte

Zali H[1] , Rezaei Tavirani M[2], Sayed Khani Nahal A[3], Moradi Sh[4]*

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: The combination of univariate and multivariate statistics can identify significant biological changes in protein expression between experimental groups. One of the most common statistical methods that help to analyze two-dimensional gel electrophoresis is the principal component analysis (PCA). In this study, the differentiation of stem cells to astrocytes studied by proteomics and cell proteome of two groups were analyzed through PCA method by an appropriate statistical software.

Matherials & Methods: Bone marrow aspirates was prepared from healthy donors and the mononuclear cells were isolated. Cells were incubated in 10% DMEM with low glucose, glutamine, streptomycin and penicillin in CO2 5% and moisture 98% at 37ºC. For differentiation of these cells into astrocytes, cells exposed to retinoic acid, cAMP, PGF, PDGF, NGF. Stem cells and astrocyte cell proteom were extracted and separated by two dimensional electrophoresis. The gels were stained using silver staining and the scanned gels were analyzed by using of bioinformatics analysis software.

Findings: Bioinformatics and statistical analysis of two-dimensional gel electrophoresis technique revealed that 774 protein spots were detected in the two groups. Comparisons between groups suggested that the expression of new proteins and the silencing of certain proteins in the signaling pathway of cell differentiation have been accoplished. Clustering analysis, divided the expressed proteins into three main clusters indicating that there were clusters of proteins with similar expression could provide similar performance in terms of testing or biological activity in the biochemical pathways.

Discusion & Conclusion: PCA analysis confirmed the clustering results showed that the protein has been classified according to the test conditions. Finally, we concluded that the differentiation makes a significant change in the level of expression of the proteome and statistical analysis like clustering and PCA can be considered as a good indicator of the protein expression changes.

Keywords: Proteomics, Principal components analysis, Astrocytes

1.Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4.Dept of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-11-24]