

بررسی بیان ژن پروتئین Opticin در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی

زهرا طهماسبی فرد^۱، کاظم پریور^۲، حجت‌الله ربانی^۳، محمود جدی تهرانی^۳، شیدا همتی^۴

^۱ مربی، دانشجوی دکترا سلولی-مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ استاد، دکترا زیست‌شناسی علوم جانوری گرایش سلولی-تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۳ دانشیار، دکترا ایمونولوژی، پژوهشکده آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشگاه فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی-ابن سينا

^۴ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، پژوهشکده آنتی‌بادی منوکلونال، پژوهشگاه فن آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی-ابن سينا

چکیده

سابقه و هدف: از دسته پروتئوگلایکان‌های کوچک غنی از لوسین عمدتاً در چشم انسان یافت می‌شود. همچنین در سطوح پایینی نسبت به چشم، در بافت‌های طبیعی مغز، غضروف، کبد و پوست نیز شناسایی شده است. در این مطالعه، بیان *opticin* در رده‌های سلول‌های سرطانی انسان بررسی شد.

روش بررسی: در این پژوهش بنیادی، رده‌های سلول‌های سرطانی انسان شامل رده سلول A-172 (سرطان مغز)، رده سلول T47D (سرطان خدد پستانی)، رده سلول Paca-2 (سرطان پانکراس)، رده سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، رده سلول Calu6 (سرطان ریه)، رده سلول ACHN (سرطان کلیه)، رده سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، رده سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، رده سلول A-375 (سرطان پوست)، رده سلول PC3 (سرطان پروستات) و رده سلول CLL-CII (سرطان لوسومی لنفوцитی مزمون) با دو روش *RT-PCR* و *Western blot* برای بیان و حضور پروتئین *opticin* مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: همه رده‌های سلول‌های سرطانی به جز A-172 در هر دو سطح mRNA و پروتئین *opticin* را بیان کردند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، رده‌های سلول‌های سرطانی انسان، بیان *opticin* را نشان دادند، در حالی که گزارشات قبلی حاکی از عدم بیان *opticin* در بافت‌های طبیعی منتظر آنها بود. این پروتئین را می‌توان بعنوان یک مارکر سرطانی در نظر گرفت و تحقیقات آینده می‌تواند بیشتر در زمینه بررسی عملکرد این پروتئین در سرطان‌زایی معطوف گردد.

واژگان کلیدی: بیان *opticin*، رده‌های سلول سرطانی، آنتی‌بادی پلی کلونال انسانی (OPTC-N).

مقدمه

بوده که دارای توالی‌های تکراری کوچک غنی از لوسین LXXLXLXXNXL (SLRPs) با سکانس حفظ شده (SLRs) می‌باشند^(۱)، که در این سکانس X هر آمینواسید، L لوسین، ایزو‌لوسین یا والین و N می‌تواند آسپارژین، سیستئین یا ترئونین باشد^(۲). امروزه ده عضو از این خانواده شناسایی شده است^(۳)، که در سه کلاس بسته به تعداد تکرارهای غنی از لوسین، فاصله چهار جزء سیستئین موجود در بخش آمینوترمینال و تعداد اگزون‌های کد کننده ژن تقسیم‌بندی می‌شوند. کلاس I و II از SLRPs دارای حدود 12LRRs بوده، در حالی که اعضاء کلاس III نظیر Opticin

ماتریکس برون سلولی (ECM: Extra Cellular Matrix) مخزنی از پروتئین‌های متصل شونده به سلول و فاکتورهای رشد است که بر رفتار سلول سرطانی تاثیر می‌گذارد^(۴). یک خانواده از این مولکول‌ها که اعمال متعددی از جمله تنظیم شکل‌گیری ماتریکس، اتصال فاکتورهای رشد و مهار رشد سلول را بر عهده دارند، پروتئین‌های ماتریکس برون سلولی

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه.
گروه زیست‌شناسی، زهرا طهماسبی فرد (email: zahran2@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۳/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۷/۲۱

مواد و روشها

در مطالعه بنیادی حاضر، برای کشت سلول‌ها، رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی شامل رده سلول A-172 (سرطان مغز)، رده سلول-2 Paca (سرطان پانکراس انسان)، رده سلول-Ej 138 (سرطان مثانه)، رده سلول Calu6 (سرطان ریه)، رده سلول ACHN (سرطان کلیه)، رده سلول SKOV3 (سرطان تخدمان)، رده سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، رده سلول A-375 (سرطان پوست) و رده سلول PC3 (سرطان پروستات) از بخش بانک سلولی انسنتیتو پاستور ایران و رده سلول T47D (سرطان غدد پستانی) و رده سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوцитی مزمن) از American Type ATCC (Culture Collection) خریداری شده و در محیط حاوی Fetal Bovine FBS (sigma) و آنتی‌بیوتیک‌ها (پنی‌سیلیین ۱۰۰ U/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شدند. همه سلول‌ها تا زمانی که به ۷۰ تا ۸۰ درصد از مرحله رشد مورد نظر برستند، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO₂ ۵ درصد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها دو بار با بافر سالین فسفات IX PBS شستشو داده شدند تا سلول‌های مرده جدا شوند. سلول‌های باقی‌مانده به کمک محیط تریپسین حاوی EDTA ۱٪ درصد مختلف سلولی با استفاده از محلول Bee Test RNA (TEL Friedswood,Tx. USA) مطابق دستور کار شرکت استخراج شد. ابتدا برای باز شدن تاخوردهای RNA، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس برای تهییه cDNA، ۱۰ میکرولیتر از RNA تام با غلظت ۱ میکروگرم در یک واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر [۱] میکرولیتر از بافر ۵X Roche, Diagnostics, Mannheim, (Roche) و ۲ میکرولیتر از ۱۰ میلی‌مولار dNTP (Germany) ۱ میکرولیتر از random hexamer (N6) ۱۰ پیکومول (Roche)، ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه‌برداری معکوس-MuLV (Roche) و ۲ میکرولیتر از H₂O استفاده شد. مخلوط واکنش‌ها در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ ساعت و سپس ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه انکوبه شدند.

دارای حدود 7LRRs Osteoglycin/mimeca و Epiphycan/PG-Lb می‌باشند (۳).

Opticin یک گلیکوپروتئین ماتریکس برون سلولی است که اولین بار در سال ۲۰۰۰ در ارتباط با فیبریل‌های کلژن زجاجیه چشم شناسایی شد. opticin یا oculoglycan تشابه سکانسی بالایی در ناحیه LRR با دو عضو دیگر این کلاس SLRP متعلق به کلاس III دارای یک ناحیه متشکل از ۸ تکرار LRR، با دو و یک جفت باند دی‌سولفیدی سیستئینی به ترتیب در دو انتهای آمینوترمینال و کربوکسی ترمینال پروتئین می‌باشند (۵).

opticin بر روی بازوی بلند کروموزوم یک در ناحیه ۳۱-۳۲ (chromosome 1q31-32) قرار داشته و یک رونوشت ۱/۶ کیلو باز از آن در چشم شناسایی شده است. چارچوب خواندنی باز (open reading frame [ORF]) آن ۹۹۶ جفت باز طول داشته و از ۳۳۲ آمینواسید تشکیل شده است (۶). این پروتئین برخلاف سایر SLRP‌ها که از زنجیرهای گلیکوز‌آمینوگلیکان تشکیل شده‌اند، دارای الیکوساکاریدهای O-Linked سیالیله در بخش آمینو ترمینال می‌باشد (۷). وزن مولکولی این پروتئین از ۴۵ کیلوالتون متغیر است. اختلاف در وزن مولکولی باخاطر گلیکوزیلاسیون و یا تغییرات بعد از ترجمه می‌باشد (۸).

مولکول opticin دارای سیگنال پپتید ۱۹ آمینواسیدی و دو ناحیه ساختاری است که یکی از آنها دارای شش تکرار غنی از لوسمین می‌باشد. این ناحیه با تکرارهای متغیر، قدرت اتصال به سایر مولکول‌ها را دارد. بعلاوه در بخش آمینوترمینال پروتئین مجموعه‌ای از محلهای O-گلیکوزیلاسیون وجود دارد که یک خصوصیت منحصر به opticin در بین پروتئینهای برون سلولی LRR به حساب می‌آید (۸).

در خصوص اعمال opticin اطلاعاتی موجود نمی‌باشد. تنها عملی که در مورد آن تاکنون شناخته شده، این است که به چندین فاکتور رشد متصل شده (۷، ۸) و تکامل و تمایز سلولها را کنترل می‌کند (۸).

در مطالعه حاضر بیان mRNA و پروتئین در رده‌های سلول‌های سرطانی گرفته شده از بافت‌های مختلف انسان، بررسی شد. بعلاوه از پروتئین نوترکیب opticin تولید شده در سلول Pichia pastoris SMD1168H سوش (بخشی از تحقیق دیگر انجام شده در پژوهشگاه این‌سینا می‌باشد) برای اطمینان از عملکرد آنتی‌بادی‌ها در شناسایی پروتئین opticin استفاده شد.

و S: ۵' CCCAAGGAAGGAGAGGAAGAGGA ۳'
 AS: ۵' GAAATGAGGTTGTTGGAGAGGTC ۳'
 طراحی شده قادر به تکثیر قطعه ۵۰۴ جفت بازی از ژن opticin می‌باشد. برای هر نمونه مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری ۲/۵ میکرولیتر از بافر X (Roche)، ۱۰X (Roche)، ۱/۵ میکرولیتر میکرولیتر از MgCl₂ ۲۵ میلی‌مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از dNTP ۱۰S از ۱۰ میلی‌مولار (Roche)، ۱ میکرولیتر از پرایمر ۱۰P پیکومول (operon)، ۱ میکرولیتر از پرایمر ۱۰AS پیکومول (operon)، ۰/۰ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche) ۱۵/۳ میکرولیتر H₂O و ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA (تھیه شد تا یک سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۳۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و سپس در انتهای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شود. محصول تکثیر شده برای هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد تا باندها در مقایسه با سایز مارک مشاهده شوند.

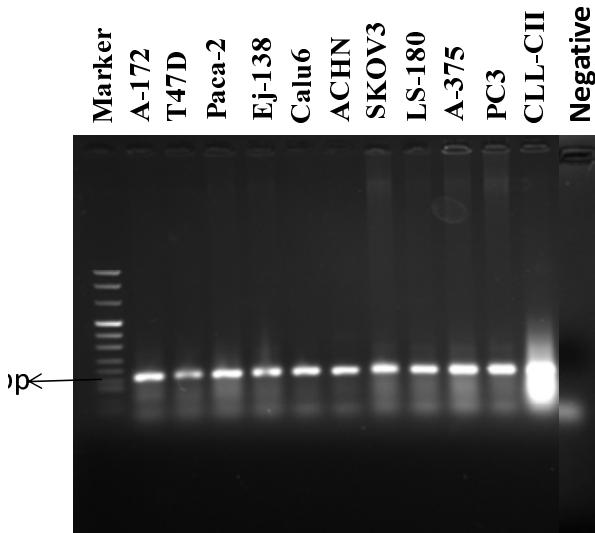
دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر علیه پپتید opticin در دو خرگوش در پژوهشگاه ابن‌سینا تولید شد. آنتی‌سرم OPTC-N (MRLLAFLSLLALVLQETGT) مطابق با سکانسی در بخش انتهای آمینی پروتئین opticin انسانی است و آنتی‌سرم OPTC-C (CDPEEHKHTRRQ) مطابق با سکانسی از بخش انتهای کربوکسی پروتئین opticin انسانی می‌باشد.

در روش Western blot، سلول‌ها پس از دو بار شستشو دادن با ۱X PBS به کمک تکنیک تریپان بلو شمارش شدند. به ازاء RIPA هر ۱۰^۴ سلول ۱ ml از بافر لیز کننده (abcam, cambridge, UK) و ۰.۱٪ مهارکننده پروتئازها (Sigma) به هر میکروتیوب افزوده شد. سلول‌ها در طی مدت ۲۰ دقیقه پس از قرارگیری در محیط حاوی بافر لیزکننده، بطور کامل لیز شده و به کمک کیت BCA (Thermo, pierce, USA) مطابق دستور کار شرکت، لیزات سلول‌ها تعیین غلظت شدند.

لیزات سلول‌ها به میزان ۶۰ میکروگرم در هر چاهک، FBS و پروتئین نوترکیب تخلیص شده با غلظت ۵ میکروگرم در هر چاهک، بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪ در شرایط بدون احیاء شدن الکتروفورز شدند. سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ Polyvinylidene Fluoride (PVDF) منتقل شده و به مدت یک شب در شیر خشک بدون چربی (Non-fat Tween ۰/۰۵) با بافر PBS به همراه dry milk

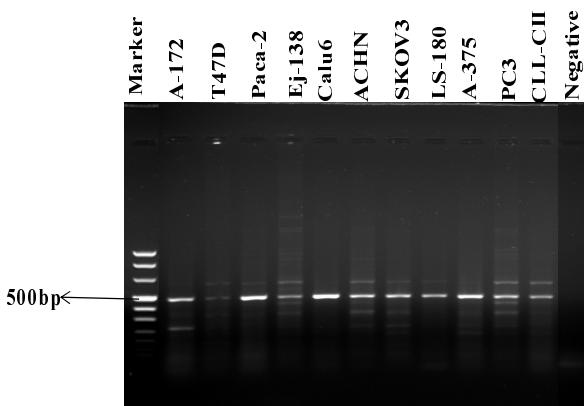
برای اطمینان از درستی سنتز، نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی بتاکتین S: ۵' TCGTAGATGGGCAC و TGAC AS: ۵' CGCGAGAAGA ۳' CCAGATCATG ۲/۵ میکرولیتری با مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر از MgCl₂ ۱/۵ میکرولیتر از بافر X (Roche)، ۱۰AS میکرولیتر از ۱۰P میکرولیتر از پرایمر ۱۰P پیکومول میلی‌مولار (Roche)، ۰/۰۰۰ میکرولیتر از پرایمر ۱۰AS پیکومول (operon, Keln, Germany)، ۰/۰۰۰ میکرولیتر از پرایمر ۱۰AS پیکومول (operon)، ۰/۰۰۰ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche)، ۱۷/۹ میکرولیتر از H₂O و ۱ میکرولیتر از نمونه cDNA (بررسی شدند و با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، برای یک نوبت ۳ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در یک سیکل برای تکثیر قطعه ۱۵۵ bp از بتا اکتین، Eppendorf Mastercycler gradient، قرار داده شد. محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید در کنار سایز مارک VIII (Roche) (الکتروفورز شدند تا باندهای مورد نظر مشاهده شوند). تکثیر ۱۰۰۰ جفت بازی قطعه opticin، با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی آن شامل پرایمر S: ۵' GCCACCATGGGGCTCCTGGCTTCCTG ۳' و AS: ۵' TCGTGAAGCGGCCGATGG ۳' مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری (۲/۵ میکرولیتر از بافر X (Roche)، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰P میکرولیتر ۱۰AS میکرولیتر از پرایمر ۱۰P پیکومول (operon)، ۱ میکرولیتر از پرایمر AS از پرایمر ۰/۰۰۰ میکرولیتر از آنزیم Taq پلیمراز (Roche)، ۱۵/۳ میکرولیتر از H₂O و ۱ میکرولیتری از نمونه سپس تھیه شد و با برنامه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل ۹۴ °C برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و در پایان یک سیکل ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه در دستگاه PCR قرار داده شد. محصول تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد.

همان‌گونه که در مطالعات قبلی (۶) ایزوفرم‌های متفاوتی از ژن opticin شناسایی شده بود، در تحقیق حاضر نیز برای تکثیر این اشکال، جفت پرایمر دیگری طراحی شد تا mRNA‌های حاصل از پردازش‌های متفاوت بر روی رونوشت اولی را شناسایی کند. پرایمر



شکل ۱- محصولات RT-PCR برای قطعه ای از ژن بتا اکتین که بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ لود شده است.

از چپ به راست: سایز مارکر VIII (Roche) ، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسيتی مزمن) و کنترل منفی



شکل ۲- محصولات RT-PCR حاصل از تکثیر قطعه opticin

از ژن opticin برای شناسایی ایزوفرمها متفاوت آن می باشد. از چپ به راست: سایز مارکر VIII (Roche) ، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول SKOV3 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسمی لنفوسيتی مزمن) و کنترل منفی

برای شناسایی رونوشت‌های حاوی طول کامل قطعه opticin مجدداً cDNA مساله‌های سلول‌ها با جفت پرایمر دیگر که منجر به تولید محصولاتی به طول ۱۰۰۰ bp می‌شد، بررسی شدند. ۱۰ میکرولیتر از محصولات تکثیر یافته بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪

(PBS-T) ۲۰ شود و به کمک آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال تولید شده بر علیه پیتید OPTC-C و OPTC-N مورد بررسی قرار گیرند. کاغذ PVDF بمدت ۱/۵ ساعت با آنتی‌بادی پلی‌کلونال اولیه با غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر به همراه PBS-T بر روی PBS-T شیکر قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان لازم، با دقیقه یک بار به مدت ۲۰ دقیقه و سه بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه HRP-Sheep anti Horseradish peroxidase rabbit (پژوهشگاه ابن سینا) که بر علیه آنتی‌بادی اولیه می‌باشد، با غلظت ۱ به ۱۵۰۰ میکرولیتر به مدت ۱/۵ ساعت به همراه PBS-T بر روی شیکر قرار گرفت. در انتهای عمل شستشو مطابق مرحله قبل تکرار شد. در نهایت با افزودن سوبسترا کمی لومینسانس GE ECL (Health care, Uppsala, Sweden) به کاغذ PVDF در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

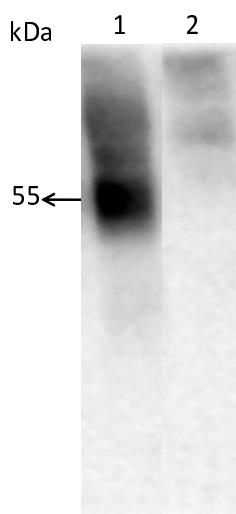
یافته‌ها

در بررسی cDNA سلول‌ها، نمونه‌های مناسب برای PCR با استفاده از تکثیر ژن Housekeeping بتا‌اکتین انتخاب می‌شوند. تکثیر موفقیت آمیز ژن بتا‌اکتین نشان داد که آن نمونه مناسب برای PCR ژن می‌باشد. محصولات PCR مربوط به تکثیر قطعه بتا‌اکتین با پرایمرهای اختصاصی به اندازه ۱۰ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ لود شدند. همان طور که انتظار می‌رفت، قطعه ۱۵۵ bp در مقایسه با سایز مارکر VIII مشهود بود (شکل ۱).

در بررسی بیان ژن opticin، پس از اطمینان از تکثیر قطعه ژن opticin با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت. ایزوفرم‌های متفاوت شناخته شده از این ژن، به کمک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شدند. سپس محصولات PCR برای هر نمونه به اندازه ۱۰ میکرولیتر بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ کتروفورز شد تا قطعه مورد نظر (۵۰۴ bp) جفت بازی در کنار سایز مارکر مشاهده شود (شکل ۲). نتیجه حاصل از تکثیر ایزوفرم‌های متفاوت opticin نشان می‌دهد که غیر از سلول T47D که باند ضعیفی را مشاهده می‌شود، در مورد سایر سلول‌ها، باند مورد نظر که ۵۰۴ bp می‌باشد، قابل شناسایی است.

بررسی بیان ژن پروتئین Opticin در سلول‌های سرطانی

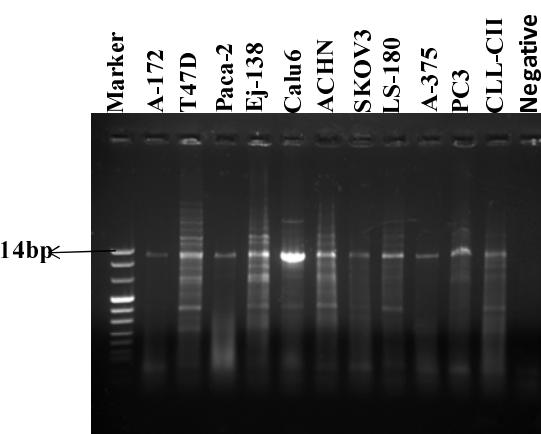
در بررسی بیان opticin در سطح پروتئین، روش دیگر برای تایید بیان این پروتئین در سلول‌های مختلف، استفاده از تکنیک وسترن بلاست می‌باشد. برای انجام این تست، از دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده بر علیه دو پپتید طراحی شده مطابق با توالی آمینوترمینال (OPTC-N) و کربوکسی ترمینال (OPTC-C) پروتئین opticin انسانی، استفاده شد. برای اطمینان از شناسایی پروتئین توسط این آنتی‌بادی‌ها، آزمون وسترن بلاست جهت تشخیص سلول مخمر تولید کننده این پروتئین و سلول مخمر نرمال از همان نوع که قادر به تولید این پروتئین نمی‌باشد، انجام گرفت. لیزات سلولهای مخمری در شرایط غیراحیاء با این آنتی‌بادی‌ها تست شدند. در شکل ۴ لیزات تهییه از سلول مخمری‌بان کننده پروتئین نوترکیب opticin انسانی با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-N مورد بررسی قرار گرفته و سه باند ۵۵ و ۷۰ و بیش از ۹۰ کیلوالتون مشاهده می‌شود که نشان دهنده گلیکوزیلاسیون متعدد بر روی پروتئین است. در شکل ۵ که همین نمونه‌ها در شرایط غیراحیاء با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-N بررسی شدند و تنها یک باند در محدوده ۵۵ کیلوالتونی مشاهده شد.



شکل ۵- بررسی عملکرد آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-N بر روی لیزات سلول مخمر. شماره ۱: لیزات نمونه مخمر بیان کننده پروتئین نوترکیب opticin؛ شماره ۲: لیزات نمونه مخمر نرمال که قدرت بیان پروتئین نوترکیب را ندارد.

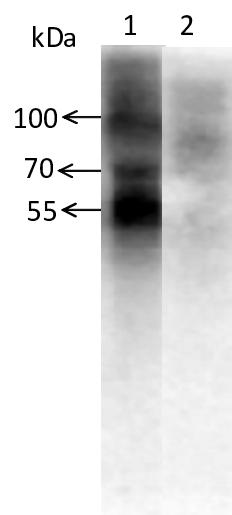
پس از تایید صحت عملکرد آنتی‌بادی، لیزات سلول‌ها در شرایط غیراحیاء با آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-C بررسی شدند. نتایج نشان دهنده حضور پروتئین opticin در دو وزن مولکولی ۳۷ و ۴۵ کیلوالتون بود. این نتیجه مطابق گزارشات قبلی از وزن مولکولی این پروتئین است (۱۰). در بررسی لیزات‌های مختلف سلولی مشاهده می‌شود که باند ۴۵

کلتروفورز شدند (شکل ۳). نتایج این بررسی هم تایید کننده بیان ژن opticin در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی بود. در مقایسه با سایز مارکر، قطعه bp ۱۰۰۰ از محصولات تکثیر یافته قابل شناسایی است.

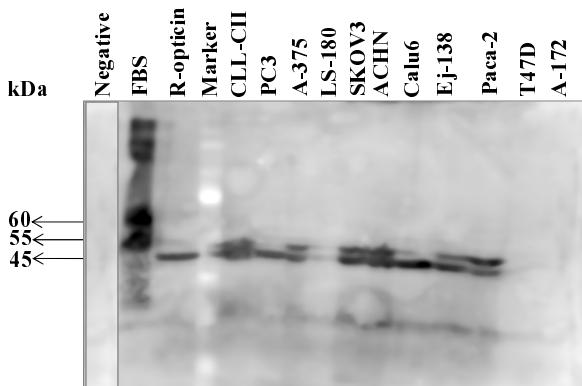


شکل ۳- محصولات RT-PCR حاصل از تکثیر طول کامل قطعه opticin به طول ۱۰۰۰ bp می‌باشد.

از چپ به راست: سایز مارکر VIII (Roche)، سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول LS-180 (سرطان تخمدان)، سلول SKOV3 (سرطان روده بزرگ)، سلول A-375 (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان بروستات)، سلول CLL-CII (سرطان لوسومی لنفوسمی مزمن) و کنترل منفی

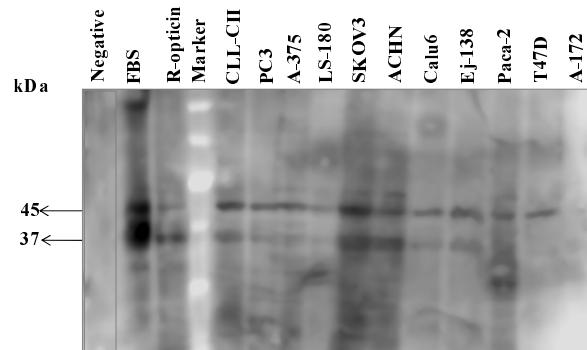


شکل ۴- بررسی عملکرد آنتی‌بادی پلی‌کلونال OPTC-C بر روی لیزات سلول مخمر. شماره ۱: لیزات نمونه مخمر بیان کننده پروتئین نوترکیب opticin؛ شماره ۲: لیزات نمونه مخمر نرمال که قدرت بیان پروتئین نوترکیب را ندارد.



شکل ۷- شناسایی پروتئین optisin در لیزات سلولهای سرطانی به کمک تکنیک وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال N-Opticin که بخش سیگنال پروتئین optisin را شناسایی می کند. از راست به چپ: سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول A-375 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول CLL-CII (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول SKOV3 (سرطان لوفوسیتی مزمن)، مارکر پروتئینی، پروتئین نوترکیب تخلیص شده از سلول مخمر، سرم جنین گاو، کنترل منفی

کیلودالتونی در تمامی نمونهها به جز نمونه سلول A-172 و باند ۳۷ کیلودالتونی به جز نمونهای T47D و A172 قابل شناسایی است. برای کنترل منفی از پروتئین نوترکیب optisin (تخلیص شده با ستون افینیتی آنتی بادی از لیزات سلولهای مخمر بیان کننده پروتئین) بدون اثر آنتی بادی پلی کلونال اولیه استفاده شد و سایر مراحل آزمایش مشابه نمونهها تکرار شد (شکل ۶).



شکل ۶- شناسایی پروتئین optisin در لیزات سلولهای سرطانی به کمک تکنیک وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال C-Opticin که بخش کربوکسی ترمینال پروتئین optisin را شناسایی می کند. از راست به چپ: سلول A-172 (سرطان مغز)، سلول T47D (سرطان غدد پستانی)، سلول Paca-2 (سرطان پانکراس انسان)، سلول Ej-138 (سرطان مثانه)، سلول Calu6 (سرطان ریه)، سلول ACHN (سرطان کلیه)، سلول A-375 (سرطان تخمدان)، سلول LS-180 (سرطان روده بزرگ)، سلول CLL-CII (سرطان پوست)، سلول PC3 (سرطان پروستات)، سلول SKOV3 (سرطان لوفوسیتی مزمن)، مارکر پروتئینی، پروتئین نوترکیب تخلیص شده از سلول مخمر، سرم جنین گاو، کنترل منفی

بحث

optc یا Opticin یکی از پروتئین‌های ماتریکس برون سلولی و از خانواده LRR می‌باشد که اولین بار در سال ۲۰۰۰ از زجاجیه چشم گاو جدا شد، به همین خاطر نام آن از کلمه optic گرفته شده است (۴). پروتئین Opticin بخارط داشتن توالی‌های تکراری از ناحیه LRR قادر به اتصال به مولکول‌های دیگر از جمله کلارن موجود در ماتریکس برون سلولی و هورمونهای رشد می‌باشد. عمل دقیق این پروتئین ناشناخته است، ولی تصور می‌شود که در رشد، تمایز و تکثیر سلولی دخالت داشته باشد (۱۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۰ با تکنیک نورترن بلات بر روی RNA استخراج شده از بافت‌های مختلف انسان انجام گرفت، مشخص شد که تنها در بافت چشم RNA مربوط به optin یا oculoglycan تحقیقات انجام شده با تکنیک RT-PCR و Western Blot نشان داد که علاوه بر چشم، در سطوح پایینی از بافت‌های مغز، غضروف، کبد و پوست انسان نیز بیان می‌شود (۹، ۱۰). در مطالعه حاضر با تکنیک RT-PCR optin تکثیر با دو جفت پرایمر اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه آنها نشان داد که همه سلول‌ها به میزان متغیری از رونوشت optin را بیان می‌کنند. همین نمونه‌ها با تکنیک

نمونه‌های لیزات سلولی مجدد در شرایط غیراحیاء با آنتی بادی پلی کلونال OPTC-N بررسی شدند (شکل ۷). این آنتی بادی قادر به شناسایی بخش سیگنال پروتئین می‌باشد. پروتئین optin گاوی با وزن مولکولی ۵۵ و ۶۰ کیلودالتونی (در رفرنس شماره ۳ نیز در همین محدوده پروتئین optin گاوی شناسایی شده است) و پروتئین نوترکیب مخمری با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتونی قابل شناسایی است. در نمونه‌های CLL-CII، A-375، Skov3، ACHN، Ej-138، Paca-2، T47D پروتئین optin بصورت دایمر در محدوده ۴۵ کیلودالتونی دیده می‌شود. دایمر شدن پروتئین در گزارشات قبلی نیز مشاهده شده است (۱۱). از بین نمونه‌های سرطانی، سلول T47D پروتئین نبالغ optin را نشان نداد و در مورد سلول A-172 نیز هیچ باندی مشاهده نشد. کنترل منفی فاقد لایه اول (آنتی بادی پلی کلونال OPTC-N) بود.

دادند. یافته آنها بیانگر این بود که opticin در پوست، چشم و غضروف بیان می‌شود (۴). در بررسی حاضر، رده‌های سلول سرطانی از مغز، پانکراس، ریه، کلیه، تخمدان، پوست، روده بزرگ، پروستات و لنفوسیت مورد بررسی قرار گرفت که قبلاً عدم وجود opticin در بافت طبیعی آنها توسط Reardon و همکارانش گزارش شده بود (۴). نتایج حاصل از تحقیق ما نشان داد که بجز در رده سلولی سرطان مغز، سایر سلول‌ها قادر به بیان opticin می‌باشند. ضمناً بیان opticin در دو رده سلولی سرطان غدد پستانی و مثانه که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بودند (۴)، در تحقیق حاضر بررسی شده و گزارش می‌شوند.

با توجه به نتایج فوق می‌توان opticin را به عنوان یک مارکر توموری جدید در نظر گرفت که در بیشتر سرطان‌ها بیان می‌شود. بیان این پروتئین در سلول‌های بدخیم نشان می‌دهد که این مولکول می‌تواند به عنوان یک هدف مناسب برای درمان سرطان در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم تحقیقات و فناوری وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی و نیز با حمایت مالی پژوهشگاه ابن‌سینا انجام گرفته است. از ریاست محترم پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی-ابن‌سینا تهران و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

وسترن‌بلات و با دو آنتی‌بادی پلی‌کلونال بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. تنها در مورد رده سلولی مشتق از سرطان مغز (A-172)، باند ضعیفی از تکثیر ژن opticin دیده می‌شود در حالی که در سطح پروتئین، بیانی از آن مشاهده نمی‌شود که می‌تواند بخارط در معرض نبودن آن محل برای اتصال آنتی‌بادی پلی‌کلونال باشد. از بین رده‌های دیگر سلولی، رده سلولی سرطان ریه در سطح RNA و پروتئین بیان بالایی را نشان می‌دهد که در تحقیقات قبلی از بافت طبیعی آن گزارشی ارائه نشده است.

از ان مولکولی بدست آمده با تکنیک وسترن‌بلات برای پروتئین opticin گاوی (موجود در FBS) با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، مطابق با گزارشات قبلی در این زمینه است (۱۱). سایزهای مختلف مولکولی احتمالاً بخارط گلیکوزیلاسیون متعدد و یا تغییرات پس از ترجمه متعدد حاصل می‌شود. آزمایشات وسترن‌بلات برای نمونه‌های سلولی با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال، نشان دهنده باند اختصاصی opticin در سایز ۳۷ و ۴۵ کیلوالتون است که با گزارشات قبلی در این زمینه مطابقت دارد (۷-۸). زیرا در بخش آمینوترمینال پروتئین opticin انسانی، محل‌های O-گلیکوزیلاسیون متعدد وجود دارد که سبب ایجاد اوزان مولکولی متفاوت می‌شود (۸).

در وسترن‌بلات انجام شده با OPTC-N اشکال دایمیری از opticin مشاهده می‌شود که در رفرنس شماره ۵ نیز اشاره شده است. این پروتئین می‌تواند به کمک نواحی LRR و باندهای دی سولفیدی سیستئینی به شکل دایمیر در آید (۱۱). Reardon و همکارانش در سال ۲۰۰۰، بیست و هشت بافت متفاوت از انسان بالغ و جنین را با RT-PCR مورد بررسی قرار

REFERENCES

1. DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MSh, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, et al. Proteases, extracellular matrix, and cancer. Am J Pathol 2004; 164: 1131-39.
2. Tasheva ES, Klocke B, Conrad GW. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. Mol Vision 2004; 10: 758-72.
3. Goff LM, Hindson VJ, Jowitt TA, Scott PG, and Bishop PN. Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution. J Biol Chem 2003; 278: 45280-87.
4. Reardon AJ, Goff LM, Briggs MD., McLeod D, Sheehan JK., Thornton DJ, et al. Identification in vitreous and molecular cloning of opticin novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. J Biol Chem 2000; 275: 2123-29.
5. Goff ML, Bishop PN. Focus on molecules opticin. Experiment Eye Res 2007; 85: 303-304.
6. Friedman JS, Faucher M, Hiscott P, Biron VL, Malenfant M, Turcotte P, et al. Protein localization in the human eye and genetic screen of opticin. Hum Mol Gen 2002; 11: 1333-42.
7. Hindson VJ, Gallagber JT, Halfter W, Bishop PN. Opticin binds to heparan and chondroitin sulfate proteoglycans. Invest Ophthalmol Visual Sci 2005; 46: 4417-23.
8. Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Aramburo C, Harvey S. Opticin bind retinal growth hormone in the embryonic vitreous. Invest Ophthalmol Visual Sci 2003; 44: 5404-409.

9. Friedman JS, Ducharme R, Raymond V, Walter MA. Isolation of a novel iris-specific and leucine-rich repeat protein (oculoglycan) using differential selection. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 2000; 41: 2059-66.
10. Hobby P, Wyatt MK, Gan W, Bernstein S, Tomarev S, Slingsby Ch, et al. Cloning, modeling and chromosomal localization for a small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family member expressed in human eye. *Mol Vision* 2000; 6: 72-78.
11. Ramesh S, Bonshek RE, Bishop PN. Immunolocalisation of opticin in the human eye. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 697-702.