بیان متمایز دو واریانت مختلف Survivin در طی تکوین مغز موش

مجتبی عمادی بایگی M.Sc.[☆]، سید جواد مولی Ph.D.[☆♦]، پروانه نیک پور M.Sc[☆]، تقی طریحی Ph.D.[★]

☆دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی:۱۷۵-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

پست الکترونیک: Email: sjmowla@modares.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۵/۱۱

* **هدف:** بررسی بیان متمایز واریانتهای مختلف ژن survivin در طی تکوین جنینی و پس از تولد در مغز موش

* **مواد و روشها:** از ۲۷ سر موش نژاد NMRI در ۹ گروه سنی مختلف (تعداد ۳ سر در هر گروه) شامل: جنینهای ۱۱ و۱۷ روزه و موش های تازه متولد شده تا یک ماهه، به فاصله هر پنج روز، نمونه گیری به عمل آمد. RNAی کل از هر مغز استخراج شد و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمر الیگو dT و آنزیم M-MLV انجام شد. cDNAی حاصل با پرایمرهای اختصاصی برای survivin و بتا ۲-میکروگلوبولین (به عنوان کنترل داخلی)، طی واکنش زنجیره ای پلیمراز تزاید یافت.

* **یافته ها:** نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که survivin در طی تکوین جنینی و پس از تولد در مغز موش بیان می‌شود. واکنش RT-PCR در مورد survivin، دو محصول تزاید یافته را با شدت های مختلف نشان داد. میزان بیان واریانت بزرگتر (survivin۱۴۰) در قبل و هنگام تولد به طور معنی داری بیشتر از بیان آن در طی تکوین پس از تولد است.

* **نتیجه گیری:** نتایج بیانگر آن است که بیان survivin ۱۴۰ در طی تکوین مغز تحت کنترل است. این کنترل، احتمالاً در هموستاز بافت مغز و تکوین سیناپس ها نقش دارد.

گل واژگان: آپوپتوز، مغز، تکوین، Survivin، RT-PCR

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۸۴-۸۱

مقدمه

برای حفظ هومئوستاز بافتی می بایستی موازنه‌ای دقیق بین زایش (میتوز) و مرگ (آپوپتوز) سلولها وجود داشته باشد. به هم خوردن این موازنه می‌تواند ناهنجاریهای متعددی مانند تومورزایی (زایش بیش از حد سلولی) و بیماریهای تحلیل رونده عصبی نظیر آلزایمر (مرگ بیش از حد سلولی) را ایجاد کند. جمعیت سلولی در یک بافت نه تنها به وسیله کنترل نرخ تقسیم سلولها بلکه به وسیله کنترل میزان مرگ سلولها تنظیم می شود. چنانچه سلولی مورد نیاز نباشد (بر اثر پیر شدن و یا آسیب غیر قابل تعمیر به DNA ی سلول) آن سلول به وسیله فعال کردن یک برنامه مرگ کنترل شونده داخل سلولی متعهد به خودکشی می شود. این فرایند مرگ برنامه ریزی شده و یا آپوپتوز نامیده می‌شود (۱، ۲).

میزان وقوع آپوپتوز در حین تکوین و نیز در بافتهای بالغ می‌تواند تا حد غیر منتظره ای بالا باشد. در تکوین سیستم عصبی مهره داران به طور طبیعی بیش از نیمی از نورونهای اولیه بلافاصله پس از زایش می‌میرند. این نورونها برای زنده ماندن نیازمند دریافت فاکتورهای رشد از بافت هدف خود می باشند. این فاکتورها به میزان بسیار محدودی تولید می شوند و نورونها برای دریافت این فاکتورها و زنده ماندن با یکدیگر رقابت می کنند. در پایان تنها آن دسته از نورونها زنده می مانند که با بافت هدف خویش ارتباط فیزیکی نزدیکی (تولید سیناپس) ایجاد کرده باشند (۳، ۴).

مسیرهای مولکولی منتهی به آپوپتوز در مسیر تکاملی کاملاً حفظ شده هستند و به وسیله پروتئینهای متعددی کنترل می شوند که یا در پیشبرد فرایند(Pro-Apoptotic) و یا در مهار آن (Anti-Apoptotic) عمل می کنند (۱، ۲). Survivin، مهارکننده آپوپتوزی است که شامل یک دامین تکراری IAP[1] باکولوویروسی بوده (۵) و قادر به تنظیم فرایندهای تکثیر سلولی و مرگ سلولی است. این پروتئین، آپوپتوز را به وسیله مهار مستقیم کاسپاز۳ و ۷ که پروتئازهای اجرایی اصلی در مسیرهای آپوپتوزی هستند، سرکوب می‌کند (۶). این ژن ترجیحاً در بافتهای جنینی و توموری که نرخ تقسیم بالایی دارند، بیان می‌شود و در سلولهای تمایز یافته بیان آن خاموش می‌شود (۵). این ویژگی سبب شده تا survivin به عنوان یک تومور مارکر جهان شمول مورد توجه قرار گیرد.

Survivin موشی دارای ۴ اگزون بوده و بر روی کروموزوم ۱۱E۲ قرار دارد. تاکنون ۳ واریانت مختلف ویرایشی از این ژن در موش گزارش شده است که سه پروتئین با نقشهای فیزیولوژیک

1. Inhibitor of Apoptosis

Archive of SID

www.SID.ir

منحصر به فرد را تولید می‌کند (۷). بزرگترین واریانت (survivin۱۴۰) محتوی هر ۴ اگزون بوده و به یک پروتئین ۱۴۰ اسید آمینه ای ترجمه می‌شود (نمودار ۱). این واریانت حاوی یک تکرار IAPمنفرد بوده که مسئول عملکرد ضد آپوپتوزی آن است و نیز دارای یک دامین coiled-coil بوده که فعالیت زیستی پروتئین را به چرخه سلولی مرتبط می سازد. واریانت دیگر، (survivin۱۲۱)، فاقد اگزون ۴، دامین coiled-coil، بوده و لیکن بخشی از اینترون ۳ را نیز داراست. واریانت سوم (survivin ۴۰) فقط حامل اگزونهای یک و سه است، فاقد هر دو دامین IAP و coiled-coil بوده و احتمالاً فاقد فعالیت ضد آپوپتوزی است (نمودار ۱). بیان هر سه واریانت با نسبتهای متفاوت در حین تکوین (از روز ۷/۵ بعد از تشکیل پلاگ) گزارش شده است (۷).

در این تحقیق سعی شده است تا میزان بیان واریانتهای مختلف ژن survivin درمغز موش در طی دوران جنینی و نیز در طی تکوین پس از تولد بررسی و با گزارشات قبلی در مورد دیگر بافتها مقایسه شود. نتایج به دست آمده وجود دو واریانت ویرایشی (survivin ۱۴۰ و survivin ۴۰) را گزارش می‌کند هر دو واریانت در دوران تکوین قبل و بعد از تولد مغز بیان می شوند. از این میان، بیان واریانت بزرگتر (survivin ۱۴۰) در تکوین قبل از تولد بیش از بیان آن در دوران پس از تولد می‌باشد.

مواد و روشها

حیوان آزمایشگاهی

موشهای نر نژاد NMRI از انستیتو رازی خریداری و تحت شرایط استاندارد از نظر آب و غذا و دیگر شرایط محیطی نگهداری شدند. گروه های سنی عبارت بودند از: جنینهای ۱۱ روزه و ۱۷ روزه (پس از تشکیل پلاگ) موش ۱ روزه (تازه متولد شده) و نیز موشهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روزه، از هر گروه سنی تعداد سه سر موش بررسی شد.

بیوپسی مغز

موشها را به روش در رفتگی مهره های گردن (Cervical dislocation) و یا به وسیله کلروفرم کشته و بعد از باز کردن جمجمه، مغز را خارج نموده و آن را در میکروتیوپی استریل و RNase-free قرار دادیم. این میکروتیوپ بعد از قرار گرفتن در نیتروژن مایع، تا مرحله استخراج در دمای ۸۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA ی کل (Total RNA) از بافت مغز

RNA ی کل با استفاده از محلول RNX plus (سیناژن) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، و نیز گزارش قبلی (۸) استخراج گردید.

بررسی کمی و کیفی RNA ی استخراج شده

غلظت یک در صد از RNA تهیه شد و جذب نوری آن در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به دست آمد. غلظت RNA بر حسب µg/µl به کمک رابطه زیر محاسبه شد:

RNA]=A]۲۶۰ x dilution x ۴۰/۱۰۰۰

نسبت $A_{۲۸۰}$ / $A_{۲۶۰}$ نیز به منظور تعیین درجه خلوص RNA محاسبه شد.

ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر با بافر TBE تهیه شد و در هر چاهک ۵ میکرو لیتر از نمونه به علاوه ۲ میکرو لیتر بافر Loading (برموفنل بلو ۰/۲۵ درصد، زیلن سیانول ۰/۲۵ درصد و گلیسرول ۳۰ درصد) ریخته شد و به مدت ۱ ساعت و با ولتاژ ۶۰–۷۰ ولت الکتروفورز گردید و سپس در زیر نور ماورائ بنفش بررسی و عکس‌برداری شد.

پرایمرها

در این تحقیق، ژن $\beta_2$microglobulin-β_2m) به عنوان کنترل داخلی انتخاب و از پرایمرهای توصیف شده در منبع (۸) استفاده شد. برای طراحی پرایمر بر روی ژن survivin موش توالی‌های مورد نیاز از طریق سایت اینترنتی NCBI (۹) با شماره دستیابی (Accession Number) AF۱۱۵۵ ۱۷ به دست آمد. پرایمر بالادست و پایین دست ژن Survivin به ترتیب روی اگزون‌های یک (از نوکلئوتید ۵۶ تا ۸۶) و سه (از نوکلئوتید۲۸۱ تا ۳۱۰) به صورت زیر و بر اساس منبع (۷)، سفارش داده شدند. همچنین در تعدادی از واکنشهای PCR از پرایمر پایین دست دومی مستقر بر اینترون ۳ (از نوکلئوتید ۶۴۰۹ تا ۶۴۲۷) استفاده شد:

۵'-TCGCCACCTTCAAGAACTGGCCCTTCCTGGA-۳': پرایمر بالادست

۵'-GTTTCAAGAATTCACTGACGGTTAGTTCTT-۳': پرایمر پایین دست۱

۵'-GGCTTCTGACAATGACAATGCTTG-۳': پرایمر پایین دست۲

پرایمرهای فوق و نیز پرایمر oligo (dT) با طول ۱۸ نوکلئوتید توسط شرکت MWG آلمان و با درجه خلوص HPSF [۲] ساخته شدند. در مورد کلیه پرایمرها، جستجو با استفاده از نرم افزار Blast (۱۰) با ژنوم موش انجام شد تا از یکتابودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم موش نشان داد که کلیه پرایمرها محل باند شدن منحصر به فردی را دارا می‌باشند.

واکنش Reverse Transcription) (RT

۵ میکروگرم از RNAی به دست آمده از بیوپسی مغز با یک میکرولیتر) dNTP ۱۰ (mM [Eurobio] یک میکرولیتر الیگو dT (۰/۵ میکروگرم) و آب به حجم ۱۲ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر [Techne] انکوبه شد و پس از انتقال بر روی یخ، بافر تکثیر ۵X [Invitrogen]: ۴ میکرولیتر، [DDT]Invitrogen(۰/۱ M):۲

1.High Purified Salt Free

Archive of SID
www.SID.ir

میکرولیتر RNasin (۴۰/Uµl) [Fermentas]: ۰/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰mM) [Eurobio]: ۰/۵ میکرولیتر و آنزیم MMLV (۲۰۰ /Uµl) [Invitrogen]: ۱ میکرو لیتر اضافه و حجم نهایی با آب به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس، ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction)

به ۵ میکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر تکثیر ۱۰X [سینان]: ۵ میکرولیتر، dNTP ۱ (۱۰mM) [Eurobio]: ۱ میکرو لیتر، آنزیم Taq Polymerase [سیناژن]: ۰/۳ واحد و مخلوط پرایمر (بالا دست و پایین دست؛ ۱۰µM) هر کدام ۲/۵ میکرولیتر و آب تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر اضافه شد و ۳۰-۲۵ سیکل به صورت Denaturation (۹۴درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه)، Annealing (۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) و Extention (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه) در دستگاه ترمال سایکلر اجرا شد. همچنین در انتهای واکنش، یک سیکل Extention نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا و محصولPCR با ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد.

هضم محصول PCR

به منظور کسب اطمینان از هویت قطعه تکثیر شده باPCR ، الگوی هضم محصول PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم ECoRI برای برش قطعه تکثیری ژن survivin انتخاب شد که این قطعه را در محل نوکلئوتید ۲۹۸ از توالی mRNA برش می زند و دو قطعه کوچک‌تر (۱۲ و ۲۴۲ جفت بازی) ایجاد می‌کند. محصول واکنش هضم با ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد بررسی شد.

آنالیز آماری

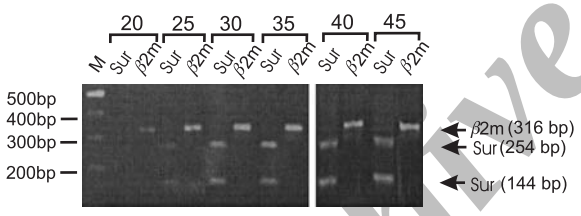
محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و به واسطه حضور اتیدیم بروماید در ژل آگارز رؤیت و از آن عکس‌برداری شد. شدت سیگنال های هر باند به کمک نرم افزار (Labimage نگارش ۲/۶، کمپانی Kapelan GmbH) سنجیده شد و نتایج حاصله از ۳ تکرار برای هر گروه سنی با آزمون های ANOVAو LOSD آنالیز آماری شد.

یافته‌ها

بهینه سازی واکنش PCR

برای بهینه سازی واکنش PCR و انتخاب تعداد سیکل مناسب، وجود سیگنال قابل رؤیت قبل از وارد شدن واکنش PCR به فاز پلاتو (plateau) ، RNAی کل (Total RNA) حاصل از بیوپسی مغز موش در شرایط RNase-free تهیه و کمیت و کیفیت RNAی به دست آمده به کمک اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (نتیجه نشان داده نشده است). در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) به وضوح قابل رؤیت است که مؤید عدم تجزیهRNA (degradation) و همچنین نسبت به دست آمده $A_{۲۸۰}/A_{۲۶۰}$ بین ۱/۸ و ۲ نشان دهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز عدم آغشتگی آن با پروتئین وDNA ی ژنومی است.

برای انتخاب تعداد سیکل مناسبPCR ، برای هر ژن ۶ تیوپ همسان حاوی مخلوط PCR تهیه شد و از سیکل ۲۰ام تا ۴۵ام، به ازاء هر ۵ سیکل، یک تیوپ از دستگاه خارج و محصول PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. باندهای حاصل متناسب با اندازه قطعه طراحی شده برای β_2m (۳۱۶bp) و ژن survivin (۲۵۴bp) می‌باشد وشدت سیگنال به دست آمده یک افزایش نسبتاً خطی در راستای افزایش تعداد سیکل PCR را نشان می دهد (شکل ۱). این نتیجه بیانگر آن است که عامل یا عوامل محدود کننده ای درمحتویات موجود در واکنش PCR به ویژه در سیکل های پایین تر وجود ندارد. برای ادامه تحقیق ازتعداد سیکل ۲۵ برای β_2m و ۳۰ برایsur vivinاستفاده شد.



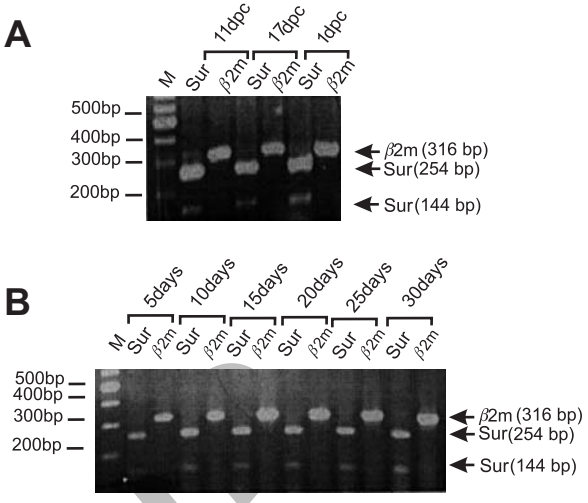
شکل ۱: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR مربوط به انتخاب تعداد مناسب سیکل PCR روی ژن survivin (۲۵۴ و ۱۴۴ جفت باز) و β_2m موش (۳۱۶ جفت باز): ستون ۱ مارکر ستون‌های بعدی به ترتیب محصول سیکل‌های ۲۰ الی ۴۵ را نشان می‌دهد

شناسایی دو واریانت ویرایشی مختلف ژن survivin

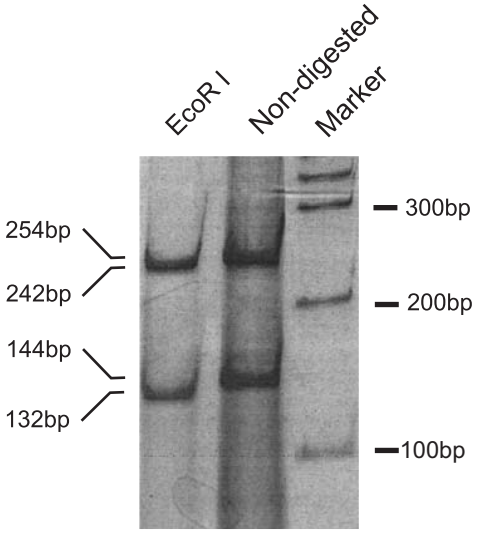
به منظور بررسی پروفیل بیان ژن survivin در مراحل مختلف تکوین، بیوپسی مغز از سنین مختلف موش(جنینهای ۱۱ و ۱۷ روزه، و نوزادان ۱ تا ۳۰ روزه) تهیه و بیان ژن survivin آنها به کمک تکنیک RT-PCR بررسی شد. در کلیه گروههای مورد بررسی علاوه بر شناسایی قطعه تکثیر شده survivin با اندازه مورد انتظار (۲۵۴bp) یک محصول دیگر با اندازه تقریبی ۱۴۴bp شناسایی شد (شکل ۱، ۲). شدت بیان این محصول در تمامی گروههای سنی به مراتب کمتر از شدت بیان محصول مورد انتظار بود. برای تایید ماهیت این دو محصول، هضم آنزیمی بر روی قطعات تزاید یافته در واکنش PCR انجام گرفت. آنزیم EcoRI با حذف یک قطعه ۱۲ جفت بازی از قسمت '۵ توالی مورد نظر تولید دو محصول کوچکتر با

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه های تقریبی ۲۴۲bp و ۱۳۲ bp را نمود (شکل ۳).



شکل ۲: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR ژنهای β_2m و survivin در طی تکوین مغز موش، قسمت A: ستون ۱ مارکر و ستون‌های بعدی به ترتیب محصول RT-PCR روی نمونه‌های RNA گروههای سنی جنین ۱۱ و ۱۷ روزه و نیز موش یک روزه را نشان می دهد. قسمت B: ستون ۱ مارکر و ستونهای بعدی به ترتیب محصول RT-PCR روی نمونه‌های RNA گروههای سنی ۵ تا ۳۰ روزه را نشان می‌دهد

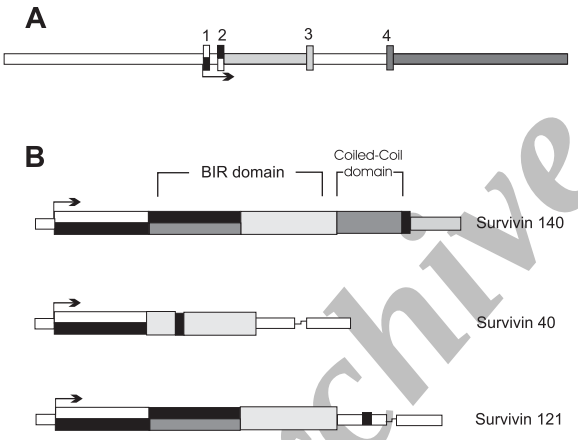


شکل ۳: طرح الکتروفورزی هضم محصول RT-PCR روی ژل پل‌آکریل‌آمید ۸ درصد. آنزیم EcoR I با حذف ۱۲bp از انتهای قطعه تکثیری از ژن survivin موشی محصولات هضم شده کوچکتری را ایجاد کرد.

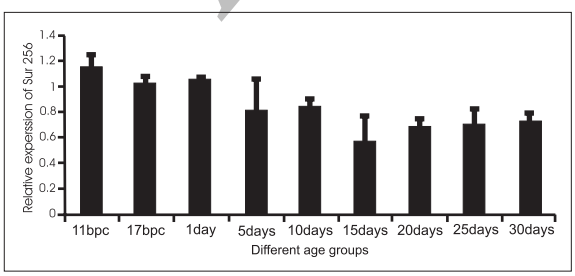
بررسی نیمه کمی واریانت های survivin در حین تکوین مغز موش

برای حصول اطمینان از اینکه RNA به میزان برابر در هر واکنش به کار رفته و تفاوت احتمالی در شدت سیگنال باند مربوط به ژن survivin هر گروه، ناشی از اختلاف در میزان RNA ی به کار رفته اولیه نبوده است، از ژن β_2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای هر گروه سنی واکنش RT PCR-با شرایط یکسان برای دو ژن survivin و β_2m انجام شد و نتایج حاصل به طور مقایسه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز محصولات PCR برای ژن، survivin دو باند با اندازه‌های مختلف را نشان داد که اندازه‌های به دست آمده معادل با اندازه قطعه تزاید یافته برای β_2m (۳۱۶ bp) و Survivin (۲۵۴ bp و ۱۴۴) می‌باشد (شکل ۲ و۳).

این آزمایش در سه سری مختلف از موش ها تکرار شد و شدت سیگنال برای کلیه باند ها به کمک نرم افزار Labimage سنجیده شد. نمودار ۲ میانگین شدت نسبی بیان واریانت بزرگتر ژن survivin (survivin ۱۴۰) به β_2 m را در گروههای مختلف سنی نشان می‌دهد. آنالیز آماری موید آن است که بیان نسبی survivin ۱۴۰ در قبل و هنگام تولد به طور معنی داری از بیان نسبی آن در بعد از تولد بیشتر می‌باشد (نمودار ۲). با این وجود بیان نسبی واریانت کوچکتر survivin (Survivin ۴۰) در قبل و بعد از تولد ثابت بود و هیچ گونه تغییر معنی‌داری را نشان نداد (نتایج نشان داده نشده است).



نمودار ۱: تصویری شماتیک از سازماندهی نواحی اگزونی و اینترونی ژن survivin بر روی کروموزوم E۲ ۱۱ (A) و نیز نحوه پردازش رونوشت اولیه در تولید سه واریانت مختلف survivin (B).



نمودار ۲: شدت نسبی محصول RT-PCR واریانت ۲۵۴ جفت بازی ژن survivin در سنین مختلف موش. اندازه گیری در هر گروه سنی به صورت شدت باند survivin به باند β_2m می‌باشد. نتایج به صورت Mean±SEM نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

برقراری یک تعادل موزون بین تکثیر سلولی، بقا سلولی و آپوپتوز نقش مهمی در تکوین سیستم عصبی و ایجاد اتصالات نورونی (تشکیل سیناپسها) دارد. از طرف دیگر برهم خوردن این تنظیم پیامدهای کلینیکی متعددی را به همراه دارد؛ به طوری که افزایش در تکثیر سلولی و یا کاهش در نرخ آپوپتوز در ایجاد انواع تومورهای مغزی و افزایش بیش از حد آپوپتوز در بیماریهای تحلیل رونده عصبی دخالت دارد (۳). در نتیجه بررسی وقایع مولکولی درگیر در تقسیم سلولی و آپوپتوز از اهمیت به سزایی در زمینه علل شناسی بیماری و نیز ارائه روشهای هوشمند درمانی برخوردار است.

Survivin عضو جدیدی از خانواده مهارکننده آپوپتوز (IAP) است که نقشی دوگانه در تنظیم تقسیم سلولی و نیز مهار آپوپتوز دارد (۵). پروتئین survivin که در فاز (G_2M/) بیان می‌شود و بیان آن در طی چرخه سلولی تنظیم می‌شود برای انجام صحیح میتوز و تقسیم سلولی مورد نیاز است و نقص در آن می‌تواند به فعال شدن یک نقطه ی کنترلی چرخه سلولی و نهایتاً القای آپوپتوز بیانجامد (۱۱). این نیاز ظاهری به survivin جهت تقسیم سلولی طبیعی پیشنهاد می‌کند که بیش بیان این پروتئین (که به عنوان مثال در بسیاری از تومورها دیده می‌شود) می‌تواند کنترل طبیعی چرخه سلولی را برهم بزند. چنین پاسخی ممکن است دلیلی مناسب برای فعالیت ضدآپوپتوزی survivin باشد و ارتباط نزدیک بین نقاط کنترلی چرخه سلولی و تعهد به آپوپتوز را نشان دهد (۱۱، ۱۲).

علی‌رغم میانجیگری ژن survivin در هومئوستازی بافتها و نقش برجسته آن در مهار آپوپتوز، تاکنون بر روی بیان ژن و نیز نسبت بیان واریانتهای مختلف آن در حین تکوین مغز هیچ‌گونه تحقیقی صورت نگرفته است. در این تحقیق برای نخستین بار بیان این ژن در طی تکوین مغز مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این تحقیق بیان دو واریانت survivin ۱۴۰ و survivin ۴۰ را در مغز گزارش می‌کند که از این میان شدت بیان survivin ۱۴۰ بیشتر از واریانت دوم بوده و نیز اینکه میزان بیان در دوران قبل از تولد بیشتر از دوران بعد از تولد است. این یافته در راستای مطالعات پیشین است که کاهش و یا خاموشی بیان این ژن را در بافتهای بالغ گزارش کرده است (۵). بیان بالای survivin در دوران قبل از تولد (و هنگام تولد) نیز یک هم‌زمانی را با اوج انجام نورون زایی در این دوران نشان می‌دهد (۱۳). در مقایسه، بیان survivin ۴۰ در تمامی گروههای سنی تقریبا ثابت ماند. نقش زیستی مستقیم و یا غیر مستقیم این واریانت در نورون زایی و آپوپتوز سیستم عصبی مشخص نیست و نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد اما احتمالاً از آنجا که survivin ۴۰ دامین پایانهٔ N را دارد ممکن است با اشکال دیگر Survivin دایمرهایی تشکیل دهد و بنابراین عملکرد کلی اشکال دیگر survivin را تنظیم و تعدیل نماید (Conway مکاتبه شخصی).

در تضاد با گزارش Conway و همکاران (۷) که بیان واریانت survivin ۱۲۱ را در اکثر بافتهای موش گزارش کرده بود، در این مطالعه وجود این واریانت در مغز تشخیص داده نشد. برای تمایز بین survivin ۱۴۰ و survivin ۱۲۱ ما از یک پرایمر پایین دست دوم که مکمل توالی موجود بر روی اینترون شماره ۳ است، استفاده کردیم (۷). این پرایمر تنها قادر به تکثیر survivin ۱۲۱ می‌باشد و واریانتهای دیگر survivin که فاقد این قطعه در رونوشت خویش هستند، تکثیر نمی شوند. به‌کارگیری این پرایمر هیچگونه محصولی را تکثیر نکرد. با توجه به اینکه در گزارش Conway و همکاران از پرایمر پایین دست (دوم) یکسانی برای تشخیص survivin ۱۲۱ استفاده شد می‌توان نتیجه گیری کرد که ین واریانت در مغز تشکیل نمی‌شود. این نتیجه‌گیری هماهنگ با یک یافته قبلی است که بیان یک واریانت انسانی معادل با واریانت، survivin ۴۰ و نه واریانت survivin ۱۲۱ را در یک لایه سلولی نوروبلاستومای انسانی گزارش کرده است (۷). اهمیت فیزیولوژیکی بیان متمایز survivin در بافتهای مختلف نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد.

وجود واریانتهای مختلف ژن survivin موسوم به survivin deltaEx3- (فاقد اگزون ۳) و survivin-2B (دارای قسمتی از اینترون ۲) در انسان نیز گزارش شده است (۱۴). این واریانتها دارای خصوصیات ضد آپوپتوتیک مختلف بوده و احتمالاً نسبت آنها به وسیله مکانیسم های کنترلی پیچیده‌ای تنظیم می‌شود. همچنین ادعا شده است که بیان این واریانتها در پیشرفت تومور و نیز در رفتار کلینیکی تومور نقش دارد (۱۵، ۱۶). گزارشی نیز مبنی بر جایابی زیر سلولی متمایز این واریانتها ارائه شده است. در حالی‌که survivin و survivin-2B ترجیحاً در سیتوپلاسم محل‌یابی شدند، survivin-deltaEx3 در هسته مستقر می‌باشد (۱۷). در یک جمع‌بندی اولیه این گونه به نظر می‌رسد که در تنظیم آپوپتوز نه تنها میزان بیان survivin بلکه نحوه پردازش رونوشت اولیه و تولید واریانتهای مختلف ویرایشی دخالت دارند. لذا بررسی بیان واریانتهای مختلف ژن در تومورهای مغزی و مقایسه آن با بافت سالم اطلاعات کلینیکی با ارزشی را به همراه خواهد داشت. اخیراً بیان گسترده ژن survivin در طیف وسیعی از تومورهای مغزی (گلیوما، منتژیما و شوآنوما) گزارش شده است؛ همچنین ادعا شده است که این بیان متناسب با درجه بدخیمی و پیش آگهی ضایعه می‌باشد (۱۸، ۱۹، ۲۰). این یافته survivin را به عنوان یک هدف بالقوه برای ایمونوتراپی تومورهای مغزی معرفی می‌کند (۲۱). در تحقیق حاضر الگوی زمانی بیان survivin در نمونه‌های به دست آمده از کل مغز تعیین شد.

با توجه به اینکه اوج نورون زایی و آپوپتوز در نواحی مختلف مغز (نظیر مخ و مخچه) از نظر زمانی تفاوتهایی را نشان می دهد (۱۳)؛ لذا بررسی دقیق‌تر از نحوه بیان ژن در سیستم عصبی نیازمند نمونه‌گیری مجزا از نواحی مختلف مغز می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه بافت مغزی از دو رده سلولی کاملاً

Archive of SID
www.SID.ir

متمایز (نورون و گلیا) تشکیل شده است و بر خلاف سلولهای نورونی، سلولهای گلیا قدرت تقسیم خود را همواره حفظ می کنند، بررسی الگوی مکانی بیان ژن به کمک تکنیک هیبریداسیون درجا و یا تعیین محل حضور پروتئین به کمک تکنیک ایمونوسیتوشیمی اطلاعات تکمیلی با ارزشی را به همراه خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها و مساعدتهای آقایان اشرفی، فراز و پوربیرانوند و نیز خانمها جمشیدی، دیداری و ابراهیمی بهره‌مند شده ایم که بدین‌وسیله از زحمات و مساعدتهای این عزیزان سپاسگزاری می شود.کلیه هزینه های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

References

1. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(6): 2239-2244

2. Li H, Yuan J: Deciphering the pathways of life and death. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11(2): 261-266

3. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD: Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science. 1993; 262(5134): 695-700

4. Gordon N: Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. Brain Dev. 1995;17(1):73-77

5. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med. 1997; 3(8): 917-921

6. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH: An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. Biochemistry. 2001; 40(4): 1117-1123

7. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC: Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. Blood. 2000; 95(4): 1435-1442.

۸. نیک پور پروانه، مولی سید جواد، موحدین منصوره: بررسی بیان ژن CatSper در بیضه موش در سنین مختلف رشد. یاخته، ۱۳۸۱ شماره، ۱۵، صفحات ۱۲۵-۱۱۹

9. National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

10. Blast the Mouse Genome: http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/ genome/ seq/ MmBlast. html

11. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T: Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(4): 1457-1462

12. Reed JC: The Survivin saga goes in vivo. J Clin Invest. 2001; 108(7): 965-969

13. Lossi L, Merighi A: In vivo cellular and olecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Prog Neurobiol. 2003 69(5): 287-312

14. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999; 59(24): 6097-6102

15. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. Br J Cancer. 2002; 86(5): 737-743

16. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. Int J Cancer. 2002; 100(1):30-36

17. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD: Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ. 2002; 9(12): 1334-1342

18. Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA: Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. Acta Neuropathol (Berl). 2002; 104(1): 105-109

19. Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. Cancer. 2003; 97(4): 1077-1083

20. Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS: Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. J Clin Oncol. 2002; 20(4): 1063-1068

21. Katoh M, Wilmotte R, Belkouch MC, de Tribolet N, Pizzolato G, Dietrich PY: Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy. J Neurooncol. 2003; 64(1-2): 71-76

Archive of SID
www.SID.ir