

بررسی فعالیت پروموتورهای فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۸ و گیرنده فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن در دو رده سلولی سرطان کولون

لادن تیموری طولابی ^۱، م.د.، کیهان آزادمنش ^۱، M.D., Ph.D.، سمیه جمالی ^۲، B.Sc.، امیرامان زاده ^۳، D.V.M.، مرتضی کریمی پور ^۱، M.D., Ph.D.، سیروس زینلی ^{۱*} Ph.D.

۱. انستیتوی پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران
۲. انستیتوی پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش هیاتیت و ایدز، تهران، ایران
۳. انستیتوی پاستور ایران، بخش بانک سلولی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۴۳۵۵۱-۱۳۱۶۹، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی

پست الکترونیک: Email: sirouszeinali@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸/۴/۸۷، پذیرش مقاله: ۸/۱۰/۸۷

مکیده

* **هدف:** ساخت سازه‌های گزارشگر با استفاده از پروموتورهای پایین دست دو مسیر سیگنالینگ Wnt و K-ras (به ترتیب پروموتورهای فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۸ (Fibroblast Growth Factor18; FGF18) و گیرنده فعال کننده یوروکینازی پلاسمینوژن (Urokinase Plasminogen Activator Receptor; UPAR) و بررسی فعالیت این دو مسیر در دو رده سلولی سرطان کولون (HCT116 و SW480)

* **مواد و روش‌ها:** پلاسمیدهای UPARLacZ و FGF18LacZ و کنترل منفی (pUCLacZ) و مثبت (CMVLacZ) و وکتور گزارشگر pRc/CMV2CAT ساخته شدند. بیان LacZ به وسیله رنگ آمیزی و الایزا پس از نرمالیزاسیون بیان β-Gal با بیان CAT (کلرامفنیکل استیل ترانسفرآز) اندازه گیری شد.

* **یافته‌ها:** در رنگ آمیزی FGF18LacZ نسبت به UPARLacZ در هر دو رده سلولی تعداد بیشتری از سلول‌ها را آبی کرده بود. این نسبت در SW480 بیشتر بود. هر دو سازه در هر دو رده سلولی دارای توانایی بیان بودند. همچنین FGF18LacZ در هر دو رده سلولی به نسبت معنی داری فعال تر از UPARLacZ می‌باشد. پروموتور FGF18 در HCT116 و SW480 به ترتیب ۱/۳۴ و ۴/۴ برابر فعال تر از پروموتور UPAR می‌باشد.

* **نتیجه‌گیری:** برخلاف اینکه در سلول HCT116 مسیر Ras فعال می‌باشد، پروموتور FGF18، فعال تر از پروموتور UPAR می‌باشد. البته پروموتور UPAR در HCT116 از SW480 فعال تر می‌باشد. این امر در راستای مطالعات پیشین می‌باشد که در همه رده‌های سلولی سرطان کولون حتی رده‌های بدون جهش در ژن‌های مسیر Wnt، مسیر Wnt فعال می‌باشد که مهم‌ترین مسیر سرطان‌زایی در سلول‌های اپی‌تلایل کولون می‌باشد. این سازه‌ها می‌تواند به عنوان ابزاری در بررسی این دو مسیر سیگنالینگ در رده‌های مختلف سلولی به کار گرفته شود.

* **کلیدواژگان:** کولون، سرطان، گیرنده فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۸، نواحی پروموتوری

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۵۳-۱۴۲

مقدمه

سالانه ۵۰۰۰۰ مورد تازه سرطان در ایران تشخیص داده می‌شود که سرطان‌های گوارشی تعداد قابل توجهی از این آمار را تشکیل می‌دهند. سرطان روده بزرگ پس از سرطان معده و مری، سومین سرطان شایع گوارشی در ایران می‌باشد (۱). این نوع بدخیمی سومین و چهارمین سرطان شایع به ترتیب در مردان و زنان ایرانی می‌باشد (۲) و در کشورهای غربی دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان را تشکیل می‌دهد (۳، ۴).

علل و عوامل مختلفی می‌تواند به عنوان عامل سرطان‌های مختلف هم‌چون کولون در نظر گرفته شود از جمله عوامل ژنتیک، محیطی و رژیم غذایی. ولی تا کنون علت شروع سرطان و پیشرفت آن به طور کامل شناسایی نشده است. در ایجاد یک توده سرطانی از بافت طبیعی اپی‌تلایل روده حداقل باید ۸-۶ جهش در بافت نرمال ایجاد شود تا توده سرطانی تشکیل گردد (۵). با ایجاد این جهش‌ها در بافت روده مسیرهای سیگنالینگ سرطان‌زا در یاخته‌ها فعال می‌شوند که برخی از آنها نقش مهم‌تری در ایجاد سرطان دارند. دو

مسیر عمده سیگنالینگ در سرطان کولون فعال است که عبارتند از مسیرهای Wnt و k-ras (۶).

مسیر سیگنالینگ Wnt مهم‌ترین مسیر سرطان‌زایی در سلول‌های کولون (۶) می‌باشد که در تکوین جنینی (۷، ۸) و تومورزایی نقش عمده‌ای دارد و در سرطان‌های دیگر هم‌چون ملانوما، سرطان هپاتوسلولار (۹)، پانکراس (۱۰) و حتی پستان (۱۱) نیز فعال می‌باشد. حتی در مواردی از سرطان کولون که هیچ‌گونه جهشی در هیچ یک از ژن‌های شناخته شده این مسیر ندارند نیز این مسیر به میزان بالایی فعال است (۱۲). با فعال شدن آن، β-catenin که در حالت نرمال با ایجاد یک مجموعه با APC و G3SK فسفریله و نشانگذاری می‌شود تا از سوی پروتئازوم دگرده (تکه تکه) شود، در سیتوپلاسم به فراوانی به صورت آزاد یافت می‌شود (۱۳) و به همین دلیل به سوی هسته سلول مهاجرت می‌کند. پس از آن به عنوان یک فاکتور رونویسی با همکاری T Cell Factor (TCF) و تبدیل آن به یک فاکتور رونویسی فعال (۱۳) و ایجاد Transcriptional Activation Domain (جزء فعال کننده

رونوئسی) در رونوئسی از ژن‌های هدف که بیشتر ژن‌های درگیر در رشد بافت‌های بدن، سرطان‌زایی و جنین‌زایی است، نقش دارد (۱۴). ژن‌های پایین دستی که به وسیله این مسیر و با مجموعه TCF/LEF فعال می‌شوند با واکاوی‌های بیان ژنی همچون داده‌های ریز آرایه‌ای بررسی شده‌اند. از ژن‌هایی که در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولون افزایش بیان دارند می‌توان SALL4 و Lymphocyte Enhancement Factor (Lef1) (۱۵)، Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (۱۶)، E-Cadherins (۱۷)، Nr-CAM (۱۸)، CyclinD1 (۲۰)، و Wnt Induced Secreted Protein (WISP) (۲۱) و Bone Morphogenic protein4 (۲۲) را نام برد.

ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor 18; FGF18) یکی از ژن‌هایی است که توسط مسیر سیگنالینگ Wnt افزایش بیان پیدا می‌کند (۲۳). فراورده این ژن یک عامل رشد تراوشی به بیرون از سلول و پلی‌پپتید متصل شونده به هپارین (۲۴) است که در تکامل غضروف‌ها و استخوان‌ها نقش عمده‌ای را ایفا می‌کند (۲۵). با این دید که مهم‌ترین سازوکار تومورزایی این است که یاخته‌ها برای رشد خود نیاز به فاکتور بیرونی ندارند و فاکتورهای رشد از درون خود یاخته‌ها به بیرون تراوش می‌شوند؛ خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی در این نقش به خوبی عمل می‌کنند. مسیر K-ras که شایع‌ترین مسیر سیگنالینگ فعال در انواع سرطان‌ها می‌باشد، حداقل در ۵۰ درصد موارد سرطان کولون فعال است (۲۶). گروه پروتئین‌های Ras شامل سه هم‌خانواده در انسان است که فاکتورهای رشدی بیرون سلول را به مسیر تیروزین کینازی درون سلولی متصل می‌کند (۲۷). در ۳۰ درصد انواع سرطان‌ها جهشی در یکی از اعضای این خانواده رخ می‌دهد (۲۸). برای نمونه، جهش در ژن k-ras در سرطان‌های دیگری همچون لوزالمعده (۲۹) و سلول‌های ناکوچک شش (Non Small Cell Lung Carcinoma) (۳۰) نیز دیده می‌شود. در پایین دست حالت فعال این پروتئین مسیره‌های سیگنالینگی چون b-Raf و MAPKK و MEK-ERK و PI3-K فعال می‌شوند (۳۱). در پایین دست این مسیره‌ها ژن‌های بسیاری نظیر Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (۳۲)، CyclinD1 (۳۳)، Fra1 (۳۴) و MMP-9 (۳۵) (ماتریکس متالوپروتیناز ۹) و یا سیکلواکسیژناز ۲ (۳۶) وجود دارند که توسط فاکتورهای رونوئسی چون SP-1، AP-1، و ets افزایش بیان می‌یابند.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA ژنومی و پلاسمیدی

استخراج DNA ژنومیک به روش Proteinase K (۵۳) و استخراج DNA پلاسمیدی به وسیله کیت Mini Prep کایژن (Qiagen, Ger-) انجام شد.

تکثیر قطعات پروموتوری

قطعه پروموتوری فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۸ از ۴۲۵- باز بالاتر از جایگاه آغاز رونوئسی تا ۳۱+ باز پایین دست آغاز رونوئسی برگزیده شد. سپس به وسیله نرم‌افزار Gene Runner، پرایمرهایی در دو سوی این قطعه طراحی شد و به وسیله Blast کردن در بانک اطلاعاتی NCBI از یکتا بودن آن اطمینان حاصل شد. پس از PCR (Eppendorf, Germany) بر روی DNA ژنومیک با پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱)، قطعه تکثیر شده با رانده شدن بر روی ژل آگاروز (Sigma, USA) از نظر اندازه مورد تایید قرار گرفت. PCR این قطعه با ترکیب زیر انجام شد:

dNTP=0.3mM, MgSo4=1.75mM, Pfu Buffer=2.5 μl, GC Buffer=5 μl, sense primer=0.2μM, Antisense Primer=0.2μM, DNA=1μl(100ng/ μl), DDW=14.75 μl Pfu DNA Polymerase=0.75 unit

برنامه PCR این قطعه عبارت بود از: 1-94° 5', 2-94° 45", 3-57° 45", 4-72° 60" in 30 cycles, 5-72° 10'

قطعه پروموتوری ژن گیرنده فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن از ۸۷۸- باز بالاتر از جایگاه آغاز رونوئسی تا ۱۷۱+ باز از نخستین آگرون توسط پرایمرهای جدول ۱ و با ترکیب و برنامه زیر از روی DNA ژنومیک مورد تکثیر قرار گرفت (مراحل طراحی پرایمر این قطعه نیز

رونوئسی) در رونوئسی از ژن‌های هدف که بیشتر ژن‌های درگیر در رشد بافت‌های بدن، سرطان‌زایی و جنین‌زایی است، نقش دارد (۱۴). ژن‌های پایین دستی که به وسیله این مسیر و با مجموعه TCF/LEF فعال می‌شوند با واکاوی‌های بیان ژنی همچون داده‌های ریز آرایه‌ای بررسی شده‌اند. از ژن‌هایی که در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان کولون افزایش بیان دارند می‌توان SALL4 و Lymphocyte Enhancement Factor (Lef1) (۱۵)، Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (۱۶)، E-Cadherins (۱۷)، Nr-CAM (۱۸)، CyclinD1 (۲۰)، و Wnt Induced Secreted Protein (WISP) (۲۱) و Bone Morphogenic protein4 (۲۲) را نام برد.

ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast Growth Factor 18; FGF18) یکی از ژن‌هایی است که توسط مسیر سیگنالینگ Wnt افزایش بیان پیدا می‌کند (۲۳). فراورده این ژن یک عامل رشد تراوشی به بیرون از سلول و پلی‌پپتید متصل شونده به هپارین (۲۴) است که در تکامل غضروف‌ها و استخوان‌ها نقش عمده‌ای را ایفا می‌کند (۲۵). با این دید که مهم‌ترین سازوکار تومورزایی این است که یاخته‌ها برای رشد خود نیاز به فاکتور بیرونی ندارند و فاکتورهای رشد از درون خود یاخته‌ها به بیرون تراوش می‌شوند؛ خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی در این نقش به خوبی عمل می‌کنند. مسیر K-ras که شایع‌ترین مسیر سیگنالینگ فعال در انواع سرطان‌ها می‌باشد، حداقل در ۵۰ درصد موارد سرطان کولون فعال است (۲۶). گروه پروتئین‌های Ras شامل سه هم‌خانواده در انسان است که فاکتورهای رشدی بیرون سلول را به مسیر تیروزین کینازی درون سلولی متصل می‌کند (۲۷). در ۳۰ درصد انواع سرطان‌ها جهشی در یکی از اعضای این خانواده رخ می‌دهد (۲۸). برای نمونه، جهش در ژن k-ras در سرطان‌های دیگری همچون لوزالمعده (۲۹) و سلول‌های ناکوچک شش (Non Small Cell Lung Carcinoma) (۳۰) نیز دیده می‌شود. در پایین دست حالت فعال این پروتئین مسیره‌های سیگنالینگی چون b-Raf و MAPKK و MEK-ERK و PI3-K فعال می‌شوند (۳۱). در پایین دست این مسیره‌ها ژن‌های بسیاری نظیر Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (۳۲)، CyclinD1 (۳۳)، Fra1 (۳۴) و MMP-9 (۳۵) (ماتریکس متالوپروتیناز ۹) و یا سیکلواکسیژناز ۲ (۳۶) وجود دارند که توسط فاکتورهای رونوئسی چون SP-1، AP-1، و ets افزایش بیان می‌یابند.

ژن گیرنده فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن (Urokinase Plasminogen Activator Receptor; UPAR) یکی از ژن‌های فعال شده به وسیله مسیر بیش فعال شده k-ras می‌باشد (۳۷)؛ این گیرنده نخست فعالیت U-PA (فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن) یا فعالیت اوروکینازی را در سطح سلول محدود می‌کند و با هیدرولیز پلاسمینوژن و فعال کردن آن باعث تکه تکه شدن (Degradation) و نوسازی (Regeneration) غشا پایه و ماتریکس خارج سلولی می‌شود. در نتیجه به صورت طبیعی موجب مهاجرت سلول‌ها می‌گردد (۳۸). این گیرنده پس از چسبیدن پروتئین فعال کننده اوروکینازی پلاسمینوژن به آن، مسیر سیگنالینگ را در سلول به راه می‌اندازد که منجر به ترمیم زخم‌ها، رگ‌زایی، آماس و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شود (۳۹). در حالت عادی این پروتئین در سلول‌هایی از سامانه ایمنی به نام یاخته‌های کشنده ذاتی

قطعات پروموتوری ژن‌های FGF18 و UPAR و CMV پس از PCR و افزودن dATP توسط آنزیم Taq DNA (Cinnagen, Iran) با ترکیب
 (PCR Buffer=5 µl, dATP=1 mM, MgCl₂=2 mM, Taq Polymerase=0.5 Unit, PCR Product=40 µl, DDW=1.5 µl) در وکتور بینایی pTZ57R/T (Fermentas, Lithuania) کلون شدند و سپس از این وکتورها به وسیله آنزیم HindIII بریده شدند و در وکتور نهایی pUC-LacZ در بالادست ژن LacZ کلون شدند.
 برای ساخت وکتور pRc/CMV2CAT ژن CAT پس از PCR و افزودن dATP توسط آنزیم Taq DNA Polymerase به ترتیبی که در بالا ذکر شد، در وکتور بینایی pTZ57R/T کلون شد و به وسیله هضم آنزیمی و PCR مورد تایید قرار گرفت و سپس با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های HindIII و XbaI (Cinnagen, Iran) در وکتور CMV pRc/CMV2 (Invitrogen, USA) در پایین دست پروموتور CMV کلون شد.

کشت سلولی و انتقال ژن به سلول‌ها

رده سلولی HCT 116 از ATCC (American Type Culture Collection) خریداری شد. رده سلولی SW480 از بانک سلولی ایران (تهران، انستیتو پاستور ایران) دریافت شد. هر دو سلول در محیط کشت DMEM High Glucose همراه با درصد (W/W) آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) کشت داده شدند و محیط کشت آنها هر سه روز یک بار تعویض می‌شد. میزان ترانس‌فکشن سلول‌ها در این دو رده سلولی به وسیله کیت‌های Polyfect, Effectene و Superfect هر سه از شرکت کیاژن (Qiagen, Germany) و Lipofectamine2000 از شرکت Invitrogen (USA) با نسبت‌های مختلف DNA پلاسمید کنترل مثبت یا pUCMV2LacZ به ماده موثره (Reagent) آزمایش شد. ۴۸ ساعت پس از ترانس‌فکشن سلول‌ها با روش رنگ آمیزی β-Gal - که در بخش بعدی درباره آن گفته خواهد شد - رنگ آمیزی شدند و پس از شمارش سلول‌های آبی شده نسبت به کل سلول‌ها، مشخص شد که بهترین کیت برای انتقال ژن به این دو رده سلولی کیت Polyfect با نسبت 800ng/8µl DNA/Reagent برای سلول‌های SW480 و 800ng/12µl برای سلول‌های HCT116 می‌باشد. جهت ترانس‌فکشن، سلول‌ها در پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت داده می‌شدند و پس از رسیدن به تراکم سلولی ۸۰ درصد یک یا دو روز پس از پخش سلول‌ها، با کیت ترانس‌فکشن Polyfect (Qiagen, Germany) ترانس‌فکت می‌شدند.

همچون مراحل ذکر شده در بالا می‌باشد) و پس از آن به وسیله رانده شدن بر روی ژل آگاروز از نظر اندازه مورد تایید قرار گرفت. ترکیب PCR عبارت بود از:

dNTP=0.4mM, MgSo4=2mM, Pfu Buffer= 2.5µl, sense primer=0.2µM, Antisense Primer= 0.2µM, DNA=1µl (100ng/µl), DDW=17.5 µl pfu DNA Polymerase=0.75unit

و برنامه آن عبارت بود از: 1-94° 5', 2-94° 30", 3-62° 45", 4-72° 120" in 30 cycles, 5-72° 10'

پرایمرهای Sense و Antisense (جدول ۱) برای تکثیر پروموتور CMV از DNA پلاسمید (Invitrogen, USA) pCDNA3.1+ نیز طراحی شدند (مراحل طراحی پرایمر همچون مراحل ذکر شده در قسمت بالا می‌باشد) تا به عنوان پروموتور کنترل مثبت مورد استفاده قرار گیرد. ترکیب و برنامه PCR این قطعه عبارت بود از:

dNTP=0.4mM, MgSo4=1.75mM, Pfu Buffer=2.5µl, Sense primer=0.2µM, Antisense Primer=0.2µM, DNA=0.1µl (100ng/µl), DDW=19.4 µl pfu DNA Polymerase=0.75unit, 1-94° 5', 2-94° 30", 3-54° 45", 4-72° 96" in 25 cycles, 5-72° 10'

برای ساخت وکتور گزارشگر Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) نیز دو پرایمر برای تکثیر CAT از روی وکتور pG5CAT (Clontech, USA)، تهیه شده از بانک ژن نو ترکیب ایران (انستیتو پاستور ایران، تهران)، طراحی شد (مراحل طراحی پرایمر همچون مراحل ذکر شده در قسمت بالا می‌باشد) که توالی آنها نیز در جدول ۱ آورده شده است. ترکیب و برنامه برای تکثیر قطعه CAT عبارت بود از:

dNTP=0.4mM, MgSo4=1.75mM, Pfu Buffer=2.5µl, Sense Primer=0.2µM, Antisense Primer=0.2µM, DNA=0.1µl (100ng/µl), DDW=19.4, pfu DNA Polymerase= 0.75unit, 1-94° 5', 2-94° 30", 3-58.5° 30", 4-72° 90" in 25 cycles, 5-72° 10'

ساخت سازه‌ها

سازه pUC-LTR-LacZ که از پیش موجود بود (۵۴) توسط آنزیم HindIII (Cinnagen, Iran) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و باز شد و پس از آن بدون پروموتور LTR دو سر وکتور دوباره به هم چسبانده و وکتور پایه pUCLacZ ساخته شد. ساخت این وکتور با راندن آن بر روی ژل آگاروز (Invitrogen, USA) و خطی شدن توسط آنزیم HindIII تایید شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای ساخت سازه‌ها

5'-AAGCTTTGCGAAAGAGCGAGTCAGCC-3'	توالی پرایمر Sense پروموتور UPAR
5'-AAGCTTGCATGAGCCACCTCATCTGACC-3'	توالی پرایمر Antisense پروموتور UPAR
5'-TGCAAGCTTAGCATCGCCTGCCAATTTG-3'	توالی پرایمر Sence پروموتور FGF18
5'-AGCAAGCTTTCATGTCTCCTCCTCCGCTCTCTC-3'	توالی پرایمر Antisense پروموتور FGF18
5'-AATAAGCTTCGATGTACGGGCCAGA-3'	توالی پرایمر Sense پروموتور CMV
5'-GGTAAGCTTAAGTTAAACGCTAG-3'	توالی پرایمر Antisense پروموتور CMV
5'-CTCAAGCTTATGGAGGAGAAAAAATCACTGGATA-3'	توالی پرایمر Sense ژن CAT
5'-CGATCTAGACGTAGCACCAGGCGAAAAAG-3'	توالی پرایمر Antisense ژن CAT

سوبسترای الیزا متوقف نشد.

اندازه‌گیری میزان بیان CAT

۱/۱۰ (۲۵ میکرولیتر) از لیز سلول‌های ترانس فکت شده با Sample Buffer کیت الیزای CAT رقیق شد و با کیت الیزا CAT بر طبق پروتوکل ارائه شده به وسیله سازنده بیان پروتئین CAT اندازه‌گیری شد. تغییر رنگ سوبسترا در فاصله‌های زمانی برابر در دستگاه الیزاخوان (Biotek, USA) با طول موج ۴۰۵ نانومتر و مرجع ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. سپس شیب‌های تغییر رنگ سوبسترا با تقسیم میزان تغییر OD به زمان تغییر رنگ محاسبه شد و حداکثر شیب الیزا بدین وسیله محاسبه شد. در این روش نیز تغییر رنگ سوبسترای الیزا متوقف نشد.

روش‌های آماری

حداکثر شیب الیزا β -Gal پس از نورمالیزاسیون (تقسیم بر حداکثر شیب الیزا CAT) در دو رده سلولی با تست آماری t test در برنامه آماری SPSS مقایسه شدند.

یافته‌ها

تایید درستی پلاسمیدهای ساخته شده

پلاسمیدهای گزارشگر ساخته شده به وسیله هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد تایید قرار گرفت. چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، در پلاسمیدهای گزارشگر ژن LacZ در پایین دست پروموتورهای CMV یا FGF18 یا UPAR قرار دارد. هم‌چنین پلاسمیدهای ساخته شده همگی توسط پرایمرهای M13F (که در بالا دست ناحیه پروموتوری قرار دارد) توالی‌یابی شدند و کلون شدن آنها توسط توالی‌یابی نیز مورد تایید قرار گرفت. نقشه پلاسمیدهای ساخته شده در شکل ۱ آورده شده است.

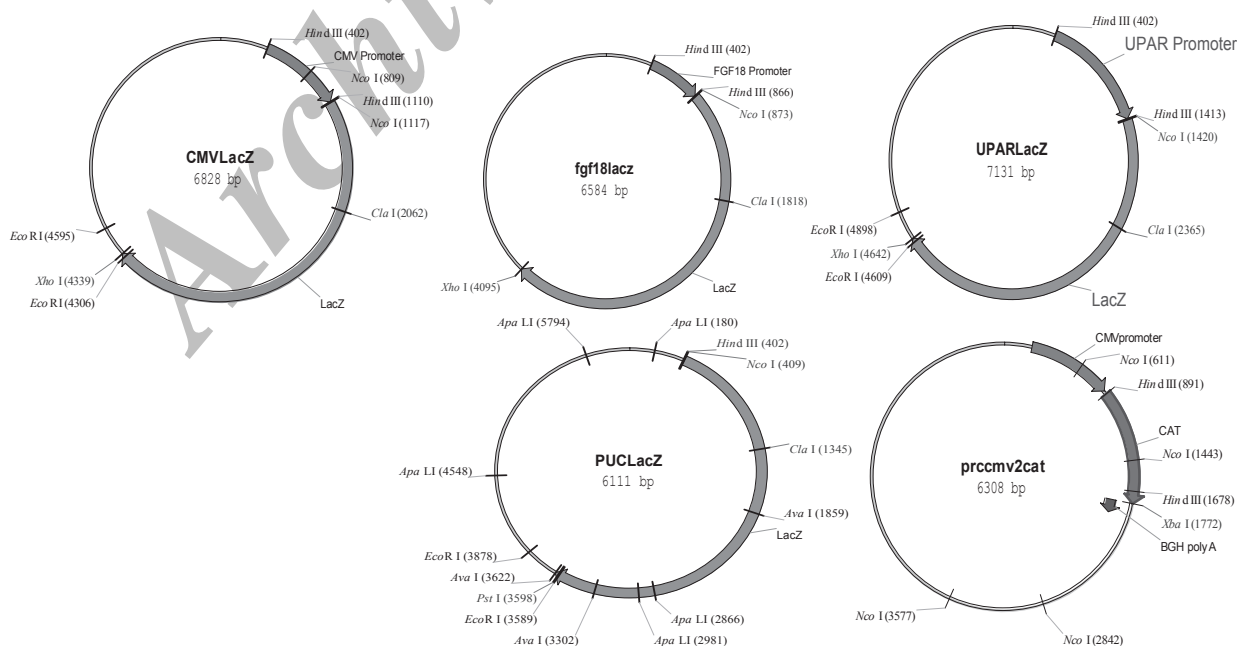
جهت بررسی میزان بیان به وسیله روش β -Gal ELISA، ترانس فکشن سلول‌ها با پلاسمیدهای گزارشگر حاوی ژن گزارشگر LacZ و پلاسمید کنترل pRc/CMV2CAT (به میزان ۱/۱۰ غلظت پلاسمید گزارشگر LacZ) به طور هم‌زمان صورت می‌گرفت.

رنگ‌آمیزی به وسیله روش رنگ‌آمیزی β -Gal Staining

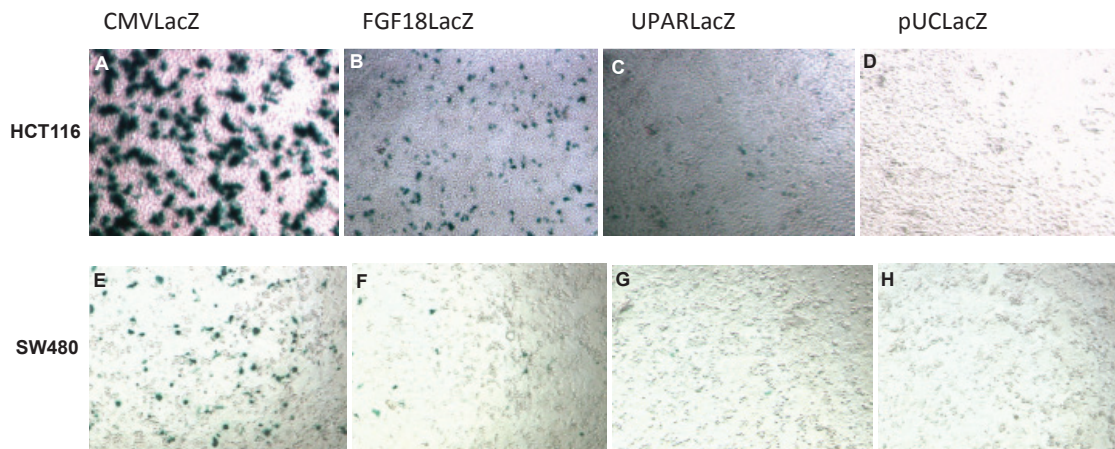
دو روز پس از Transfection سلول‌ها به وسیله پلاسمیدهای گزارشگر pUCFGF18LacZ، pUCUPARLacZ و pUCCMVlacZ به عنوان کنترل مثبت و پلاسمید pUCLacZ به عنوان کنترل منفی، پس از فیکس شدن با روش رنگ‌آمیزی β -Gal Staining بر اساس روش‌های ذکر شده در مقاله آزادمنش و همکاران (۵۴) رنگ‌آمیزی شدند. به طور خلاصه سلول‌های ترانس فکت شده در ۱۰ میدان ۴۰۰ برابر شمارش شدند و نسبت سلول‌های آبی شده به کل سلول‌ها محاسبه گردید. بدین وسیله نتایج رنگ‌آمیزی نیمه کمی شد.

اندازه‌گیری بیان LacZ به روش کمی

دو روز پس از ترانس فکشن سلول‌ها با پلاسمیدهای گزارشگر به وسیله بافر لیز سلولی (Roche Applied Science, Germany) لیز شدند و ۲۰۰ میکرولیتر از لیز سلولی در پلیت‌های الیزا ریخته شد و الیزا با کیت الیزای β -Gal (Roche Applied Sciences, Germany) انجام شد. روش خواندن الیزا بدین ترتیب بود که تغییر رنگ سوبسترا در فاصله‌های زمانی برابر در دستگاه الیزاخوان (Biotek, USA) با طول موج ۴۰۵ نانومتر و مرجع ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. پس از آن شیب‌های تغییر رنگ سوبسترا با تقسیم میزان تغییر OD به زمان تغییر رنگ محاسبه شد و حداکثر شیب الیزا بدین وسیله محاسبه شد. همچنان که از روش بالا برمی‌آید در این روش تغییر رنگ



شکل ۱: نقشه پلاسمیدهای ساخته شده. نام هر یک از پلاسمیدها در درون شکل پلاسمید آورده شده است.



شکل ۲: نتایج رنگ‌آمیزی دو رده سلولی HCT116 و SW480 با روش نیمه کمی رنگ‌آمیزی β-Gal (۱۰۰× مقیاس)
 A: رده سلولی HCT116 ترانس فکت شده با پلاسمید CMVLacZ
 B: رده سلولی HCT116 ترانس فکت شده با پلاسمید FGF18LacZ
 C: رده سلولی HCT116 ترانس فکت شده با پلاسمید UPARLacZ
 D: رده سلولی HCT116 ترانس فکت شده با پلاسمید pUCLacZ
 E: رده سلولی SW480 ترانس فکت شده با پلاسمید CMVLacZ
 F: رده سلولی SW480 ترانس فکت شده با پلاسمید FGF18LacZ
 G: رده سلولی SW480 ترانس فکت شده با پلاسمید UPARLacZ
 H: رده سلولی SW480 ترانس فکت شده با پلاسمید pUCLacZ

رنگ‌آمیزی سلول‌ها

میزان بیان پروتئین β-Gal در سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمیدهای گزارشگر در مقایسه با پلاسمید pUCCMVlacZ به عنوان کنترل مثبت و pUCLacZ به عنوان کنترل منفی در دو رده سلولی HCT116 و SW480 با رنگ‌آمیزی بتا گالاکتوزیداز (به صورت نیمه کمی) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد سلول‌های HCT116 در مقایسه با سلول‌های SW480 بهتر ترانس فکت شده‌اند که این امر در مقایسه بین سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمید pUCCMVlacZ (به عنوان کنترل مثبت دارای بیان کنترل نشده و ثابت) مشاهده می‌شود (شکل ۲A نسبت به شکل ۲E). چنانچه در این شکل می‌بینیم سلول‌های HCT116 دارای نقاط آبی بیشتری نسبت به سلول‌های SW480 می‌باشند و این نکته با توجه به اینکه ترانس فکشن در هر دو رده سلولی بهینه شده بود؛ نشان دهنده این است که سلول‌های رده HCT116 به میزان بیشتری پذیرای DNA هستند. همچنین در شکل‌های ۲B و ۲F مشاهده می‌شود که پروموتور FGF18 در هر دو سلول نسبت به پروموتور UPAR (شکل‌های ۲C و ۲G) بیشتر باعث بیان ژن LacZ شده است و این تفاوت در رده سلولی SW480 به وضوح بیشتری مشاهده می‌شود.

نتایج الیزا β-GAL

عصاره سلولی دو رده سلولی HCT116 و SW480 در زمان‌های مساوی برداشته شد و میانگین نتایج پیش و پس از نرمالیزاسیون (یعنی پس از تقسیم حداکثر شیب الیزای β-Gal بر حداکثر شیب CAT) در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است. با توجه به اینکه حداکثر شیب β-Gal نمی‌توانست به تنهایی ثابت کننده میزان بیان در هر یک از چاهک‌ها باشد می‌بایست با بیان پروتئین دیگری یا میزان کل پروتئین‌های هر چاهک استاندارد می‌شد، میزان بیان β-Gal با میزان بیان CAT - که توسط پروموتور CMV بیان ثابتی در همه سلول‌ها داشت - نرمالیزه شد. با توجه به نتایجی که در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است می‌توان به این نتیجه رسید که پروموتور FGF18 در هر دو رده سلولی مطالعه شده، دارای فعالیت بیشتری از پروموتور UPAR می‌باشد.

در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود که میزان بیان ژن LacZ در سلول‌های ترانس فکت شده با پلاسمید pUCCMVlacZ به طرز معنی‌داری از میزان بیان این ژن در سلول‌هایی که با دو پلاسمید بیانی دیگر (pUCUPARLacZ و pUCFGF18LacZ) ترانس فکت شده‌اند، بیشتر می‌باشد. بنابراین برای بررسی فعالیت این دو پروموتور نیاز به مقایسه آنها با یکدیگر در رده‌های سلولی متفاوت می‌باشد. اعداد محاسبه شده برای میزان بیان ژن گزارشگر LacZ در رده

در سلول‌های HCT116 نیز مشاهده می‌شود که سازه دارای

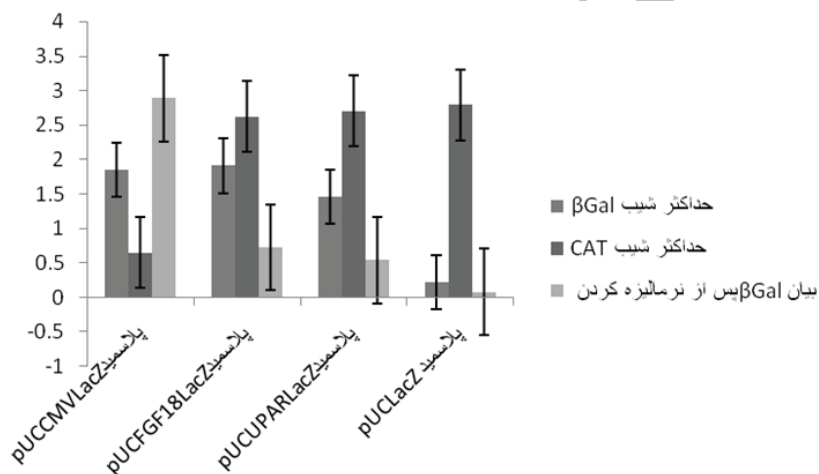
پس از شمارش سلول‌های رنگ‌آمیزی شده و تقسیم آن بر تعداد کل سلول‌ها و محاسبه میزان بیان به صورت نیمه کمی مشاهده شد که پروموتور FGF18، ۵ درصد سلول‌های SW480 را آبی رنگ کرده است، در حالی که پروموتور UPAR کمتر از ۰/۵ درصد این سلول‌ها را به رنگ آبی در آورده است. در کنار آن پروموتور CMV در حدود ۳۵ درصد سلول‌ها را آبی رنگ کرده است. چنانچه در شکل ۲H مشاهده می‌شود، سازه بدون پروموتور هیچ کدام از سلول‌ها را آبی رنگ نکرده است.

در سلول‌های HCT116 نیز مشاهده می‌شود که سازه دارای

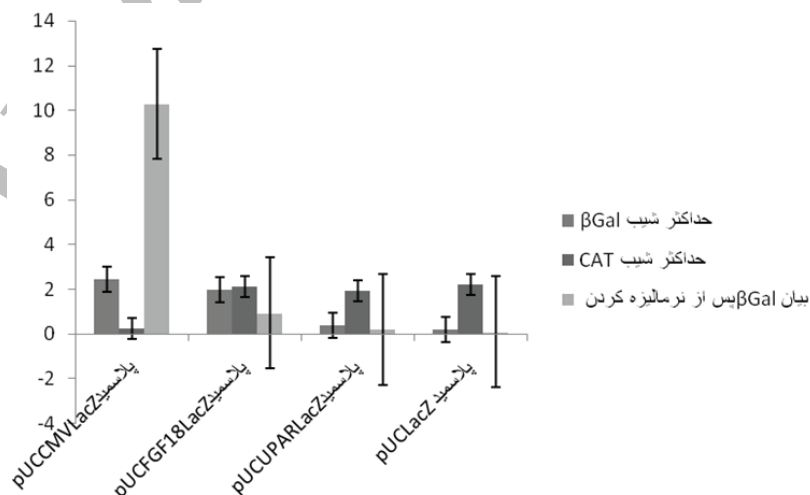
مقایسه پروموتورهای FGF18 و UPAR در سلول‌های سرطانی کولون

در رده سلولی SW480 که مسیر سیگنالینگ Wnt در آن فعال می‌باشد، می‌توان به ترتیب گفت اعداد محاسبه شده برای میانگین میزان بیان ژن گزارشگر LacZ تحت پروموتورهای مطالعه شده به ترتیب برای پروموتور CMV، ۱۰/۲۸، برای پروموتور FGF18، ۰/۹۳، برای پروموتور UPAR، ۰/۲۱ و برای پلاسמיד بدون پروموتور ۰/۸۵ می‌باشد. پس از تقسیم میزان بیان با پروموتورهای اختصاصی بر میزان بیان ژن گزارشگر با پروموتور CMV می‌توان نتیجه گرفت که میزان بیان ژن با پروموتور FGF18، ۰/۰۹ برابر CMV می‌باشد و میزان بیان با پروموتور UPAR، ۰/۰۲ برابر پروموتور CMV می‌باشد. میزان بیان با پروموتور UPAR هرچند بسیار کم می‌باشد ولی از میزان بیان با پلاسמיד بدون پروموتور بیشتر می‌باشد.

سلولی HCT116 ترانس فکت شده با پلاسמידهای CMVLacZ و FGF18LacZ و UPARLacZ پس از نرمالیزاسیون به صورت میانگین عبارتند از ۲/۸۵ و ۰/۷۲۸ و ۰/۵۳۹ و ۰/۰۷۹. با تقسیم این اعداد بر میزان بیان این ژن تحت پروموتور CMV که یک پروموتور با بیان پایه بالا و غیر قابل کنترل می‌باشد می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که پروموتور FGF18 در رده سلولی HCT116 ۰/۲۵ برابر پروموتور CMV فعال می‌باشد. هم‌چنین پس از تقسیم میزان بیان اندازه‌گیری شده ژن گزارشگر تحت پروموتور UPAR بر میزان بیان این ژن تحت پروموتور CMV می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که پروموتور UPAR در این رده سلولی ۰/۱۸۷ برابر پروموتور CMV فعال می‌باشد.



نمودار ۱: میانگین بیان β-Gal در سلول‌های HCT116 ترانس فکت شده با ۴ پلاسמיד ساخته شده: ستون‌های نخست مربوط به هر پلاسמיד؛ میانگین بیان خام β-Gal اندازه‌گیری شده به روش ELISA در یک سری ترانس فکشن، ستون‌های دوم؛ میانگین بیان خام CAT در همان سری ترانس فکشن اندازه‌گیری شده به روش ELISA و ستون‌های سوم مربوط به هر پلاسמיד؛ میانگین بیان β-Gal پس از نرمالیزه کردن بیان آن با بیان CAT می‌باشد. خطوط مشکی در میان هر ستون میزان خطای استاندارد (Standard Error) محاسبه شده به روش‌های آماری را نشان می‌دهد.



نمودار ۲: میانگین بیان β-Gal در سلول‌های SW480 ترانس فکت شده با ۴ پلاسמיד ساخته شده: ستون‌های نخست مربوط به هر پلاسמיד؛ میانگین بیان خام β-Gal اندازه‌گیری شده به روش ELISA در یک سری ترانس فکشن، ستون‌های دوم؛ میانگین بیان خام CAT در همان سری ترانس فکشن اندازه‌گیری شده به روش ELISA و ستون‌های سوم مربوط به هر پلاسמיד؛ میانگین بیان β-Gal پس از نرمالیزه کردن بیان آن با بیان CAT می‌باشد. خطوط مشکی در میان هر ستون میزان خطای استاندارد (Standard Error) محاسبه شده به روش‌های آماری را نشان می‌دهد.

پروموتور این ژن عمل می‌کند، شناسایی شده است که یکی در ناحیه ۱۸۰- (۵۹) و دیگری در ناحیه ۷۰- از آغاز رونویسی است. هم‌چنین گفته شده است ناحیه‌ای ۱۸۰ بازی میان ۱۴۱- تا ۴۷+ ناحیه اصلی پروموتوری این ژن می‌باشد. نواحی از این پروموتور که در پاسخ به آسپیرین و از طریق فاکتور رونویسی AP-1 در رده‌های سلولی سرطان کولون نقش دارد نیز در ۳۹۸- باز از ناحیه آغاز رونویسی قرار دارد (۶۰).

همان‌طور که اشاره شد افزایش β -catenin یا پروتئین‌های دیگر مسیر Wnt باعث افزایش بیان دو ژن c-fos و Fra-1 می‌شود و این پروتئین‌ها با یکدیگر مجموعه AP-1 را تشکیل می‌دهند (۵۷). این مجموعه نیز باعث رونویسی از ژن UPAR می‌شود (۶۱). به همین دلیل در برخی مقالات ذکر شده است که بیان این ژن به وسیله مسیر Wnt نیز فعال می‌شود (۶۲).

به همین دلیل از ۸۰۰ باز بالاتر از جایگاه آغاز رونویسی برای ساخت سازه گزارشگر دارای ناحیه پروموتوری UPAR مورد استفاده قرار گرفت تا دست کم دارای جایگاه‌های چسبیدن AP1 و SP1 باشد (۵۷، ۶۰، ۶۳).

نواحی انتخاب شده همگی کمی بزرگ‌تر از حد جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی بودند به این دلیل که قصد داشتیم شرایط نسبتاً طبیعی بیان در سلول‌های بدن را در رده‌های سلولی مورد تقلید قرار دهیم تا اگر مکان‌های ناشناخته‌ای برای اتصال فاکتورهای مهار کننده و تحریک کننده در بازهای بالا یا پایین‌تر وجود داشته باشد، آن را نیز در سازه بیانی خود آورده باشیم. هم‌چنین به منظور اطمینان از آغاز طبیعی رونویسی، قسمتی از پایین دست نقطه آغاز رونویسی (پیش از رسیدن به نقطه آغاز ترجمه=5'UTR) نیز در هر پروموتور انتخاب گردید.

بر اساس نتایج رنگ‌آمیزی و الیزا در دو رده سلولی HCT116 و SW480، می‌توان نتیجه گرفت که پروموتور FGF18 که تنها دارای یک جایگاه برای اتصال TCF/LEF1 می‌باشد، در هر دو رده سلولی دارای فعالیت بیشتری نسبت به پروموتور UPAR است. انتظار می‌رود با توجه به آنکه جهش در بالادست مسیر سیگنالینگ Ras در رده سلولی HCT116 ثابت شده است، پروموتور UPAR در این رده سلولی نسبت به پروموتور FGF18 فعال‌تر باشد ولی نتایج الیزا خلاف این مسئله را نشان می‌دهد. البته برتری پروموتور FGF18 نسبت به پروموتور UPAR در رده سلولی SW480 از رده سلولی HCT116 بیشتر (با توجه به p ها و نسبت‌های محاسبه شده) می‌باشد و این بر اساس دانسته‌های پیشین است که مسیر سیگنالینگ Wnt در رده سلولی SW480 نسبت به HCT116 فعال‌تر است. بر پایه برخی مقالات (۶۴)، حتی اگر علت سرطان‌زایی در کولون فعال شدن سیگنالینگ پایین دست K-ras باشد، مسیر Wnt نیز در این سلول‌ها فعال می‌شود. هم‌چنین در مواردی مشاهده شده است که مسیر K-ras نیز توسط مسیر Wnt فعال می‌شود (۶).

با توجه به آنکه بررسی روی ژن فاکتور رشد فیروبلاستی ۱۸ بسیار نوپا می‌باشد، می‌توان حدس زد که شاید در پروموتور این ژن نیز جایگاه‌هایی برای اتصال فاکتورهای پایین دست مسیر سیگنالینگ K-ras موجود باشد و این مسئله می‌تواند در طراحی مطالعات بعدی و در بررسی‌های بیوانفورماتیک پس از آن مد نظر قرار گیرد.

چنانچه مشاهده شد بیان ژن گزارشگر تحت تاثیر پروموتور UPAR حتی در رده سلول‌هایی که بالادست این ژن (مسیر K-ras)

با توجه به آنچه که گفته شد، می‌توان نتیجه گرفت که دو پروموتور FGF18 و UPAR در رده سلولی HCT116 فعال‌تر از رده سلولی SW480 می‌باشد. این مسئله با توجه به میزان بیان ژن گزارشگر با این پروموتورها نسبت به بیان تحت کنترل پروموتور CMV قابل نتیجه‌گیری است. به همین ترتیب در هر دو رده سلولی SW480 و HCT116 پروموتور FGF18 از پروموتور UPAR فعال‌تر می‌باشد که در رده سلولی HCT116 این میزان ۱/۳۴ برابر و در رده سلولی SW480 این میزان ۴/۴ برابر می‌باشد.

پس از این واکاوی نخستین، تست آماری t test برای مقایسه نتایج الیزای ناشی از ترانس فکت شدن پلاسمیدهای مختلف در رده‌های مختلف سلولی انجام شد.

در رده سلولی SW480 با $p=0/004$ بیان پروتئین گزارشگر تحت پروموتور FGF18 از نتایج الیزای پلاسمید بدون پروموتور بالاتر بود و با پروموتور UPAR، بیان پروتئین گزارشگر با $p=0/008$ از پلاسمید بدون پروموتور بالاتر بود.

در رده سلولی HCT116 نیز نتایج الیزا با پروموتور FGF18 و UPAR از نتایج الیزا با پلاسمید بدون پروموتور با p های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۴ متفاوت و بالاتر بود.

بیان با پروموتورهای FGF18 و UPAR در رده سلولی HCT116 با $p=0/025$ از یکدیگر متفاوت می‌باشد. در صورتی که نتایج الیزای این دو گونه پلاسمید در رده سلولی SW480 با $p=0/004$ از یکدیگر متفاوت می‌باشد که این مساله نشان می‌دهد که این دو پلاسمید تفاوت واضح‌تری در رده سلولی SW480 دارند.

بحث

در این پژوهش سعی گردید با برگزیدن بهترین نواحی پروموتوری دو ژن پایین دست مسیرهای سیگنالینگ K-ras و Wnt (ژن‌های UPAR و FGF18)، سازه‌های گزارشگری برای بررسی فعالیت این دو مسیر در رده‌های سلولی HCT 116 و SW480 ساخته شوند.

پروموتور ژن FGF18 با دارا بودن یک جایگاه اتصال فاکتور رونویسی TCF/LEF1 می‌تواند به عنوان یک الگوی کلاسیک تحریک شده به وسیله مسیر Wnt مطرح باشد. با توجه به مطالعات انجام شده جایگاه چسبیدن TCF/LEF1 در پروموتور ژن FGF18 در ۱۹۰- باز از ناحیه آغاز رونویسی قرار دارد و مهم‌ترین عامل بیان آن در سلول‌های سرطانی کولون می‌باشد (۲۳). به همین دلیل از ۴۰۰ باز بالاتر از جایگاه آغاز رونویسی ژن برای ساخت سازه گزارشگر تحت کنترل پروموتور FGF18 مورد استفاده قرار گرفت تا به طور حتم دارای جایگاه چسبیدن فاکتور رونویسی TCF/LEF باشد.

ژن UPAR نیز به وسیله مسیر MEK/ERK در پایین دست k-ras، بیان بالایی پیدا می‌کند (۵۵). رونویسی از این ژن به وسیله فاکتورهای رونویسی چون Sp-1 (۵۶) و AP-1 (۵۷) فعال می‌شود. بنابراین این ژن می‌تواند به عنوان یک الگوی کلاسیک ژن‌های تحریک شده با مسیر سیگنالینگ K-ras مطرح باشد. با بررسی مقالات این طور به نظر می‌رسد که نواحی پروموتوری مختلفی در بیان پروتئین (UPAR) یکی از آنها ناحیه پروموتوری در ۱۴۱- تا ۶۰- است که فاکتور رونویسی AP-1 به آن می‌چسبد. در برخی مقالات نیز ذکر شده است که مناطق میان ۱۳۶- تا ۴+ در بیان ژن UPAR نقش دارند (۵۸). در مقالات دیگری نیز دو ناحیه که فاکتور رونویسی Ap-1 در

است و بر این اساس سیگنال‌های درون سلولی چون ERK/MAPKK بر خلاف جهش در ژن k-ras به صورت فعالانه‌ای دارای باز خورد مثبت نبوده‌اند.

نتیجه گیری

از آنچه گفته شد، می‌توان این نتیجه را گرفت که مسیر سیگنالینگ Wnt و یا حداقل جزئی از این مسیر که باعث افزایش بیان فاکتور رشدی چون FGF18 می‌شود، جز جدایی ناپذیری از سرطان‌زایی در سلول‌های اپی‌لیال کولون یا دست کم در این دو رده سلولی می‌باشد. حتی در مواردی که جهش‌هایی در اجزایی از مسیرهای دیگر باعث بدخیمی سلول‌های اپی‌لیال کولون شده باشد این مسیر و با توجه به آنچه در این پژوهش به دست آمده است پروموتور ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۸ فعال می‌شود.

بر اساس مشاهده فوق در پژوهش می‌توان گفت ژن‌هایی که در پروموتورشان دارای جایگاه‌هایی برای اتصال TCF/LEF1 باشند می‌توانند به عنوان کاندیدهای مناسبی برای بیان ژن‌های گزارشگر و ژن‌های دیگر درمانی همچون ژن‌های خودکشی در سلول‌های سرطانی کولون مورد استفاده قرار گیرند.

از این نظر که ژن درمانی پس از درمان‌های سنتی همچون جراحی یا شیمی درمانی یا پرتودرمانی می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های درمانی سرطان مورد استفاده قرار گیرد؛ ساخت سازه گزارشگری که در سلول‌های سرطانی فعال باشد و در سلول‌های نرمال بدن فعال نباشد، اهمیتی دو چندان می‌یابد. پس از ساخت این سازه‌ها و بررسی بیان آنها در سلول‌های سرطانی، می‌توان از بهترین پروموتورهای فعال شده در سلول‌های توموری کولون برای قرار دادن آنها در بالا دست ژن‌های خودکشی و درست کردن بهترین سازه‌های خودکشی استفاده کرد. هم‌چنین می‌توان از این پروموتورها برای بررسی فعالیت مسیرهای مختلف سیگنالینگ در سلول‌های مختلف بهره برد. همچنان که می‌توان سازه‌های فعال شده به وسیله مسیر Wnt هم چون FGF18LacZ را برای بررسی فعالیت این مسیر در رده‌های سلولی مختلف و رده‌های تازه ساخته شده به کار برد.

بهترین راهکار پس از این پژوهش این است که پروموتورهای دیگر فعال شده با مسیرهای سیگنالینگ Wnt و همچنین K-ras را به همین ترتیب در بالای ژن گزارشگری چون LacZ قرار دهیم و بیان ژن گزارشگر را با همین روش در سلول‌های مختلف برای شناخت بیشتر اجزای سیگنالینگ و ژن‌های فعال شده در سرطان کولون مورد بررسی قرار دهیم.

تقدیر و تشکر

از جناب آقای دکتر مجید گلکار و جناب آقای دکتر محمد علی شکر گزار که در مراحل از این کار همکاری صادقانه داشته‌اند تقدیر و تشکر می‌شود. کلیه هزینه‌های مالی این پژوهش از سوی انیستیتو پاستور ایران تامین شده است.

References

1. Mohebbi M, Mahmoodi M, Wolfe R, Nourijelyani K, Mohammad K, Zeraati H, et al. Geographical spread of gastrointestinal tract cancer incidence in the Caspian

فعال است نیز کم بود. در این مطالعه جهت تقلید از حالت طبیعی موجود در سلول بهترین قطعه پروموتوری ژن UPAR (شامل نواحی پیش و پس از جایگاه آغاز رونویسی) دارای جایگاه‌های چسبیدن اجزای پایین دست مسیر سیگنالینگ K-ras و حتی بیشتر از آن در بالادست ژن LacZ قرار داده شد. در هیچ کدام از مقالاتی که تا کنون به چاپ رسیده است، ناحیه‌ای که مهار کننده‌های بیان در حدود ۸۰۰ باز بالاتر از ژن به آن بچسبند، یافت نشده است (۵۷، ۶۳)، تنها سورواویا و همکاران در مقاله خود به این نکته اشاره کرده‌اند که بیان ژن گزارشگر با پروموتور ۲/۳ کیلوبازی از بیان توسط پروموتور کوتاه شده ۴۰۰ بازی کمی کمتر می‌باشد (۶۳). به همین دلیل این احتمال را که به علت برگزیدن ناحیه‌ای که دارای جایگاه اتصال مهار کننده‌ها است، بیان ژن کم شده باشد، نمی‌توان نادیده گرفت. آنچه با این فرضیه مطرح می‌شود این است که این نواحی مهار کننده که به نظر می‌رسد برای مهار بیان ژن در سلول‌های نرمال باشد، در سلول‌های توموری نیز عمل کرده است. این احتمال نیز که این ژن به اشتباه به عنوان هدفی در پایین دست مسیر سیگنالینگ Ras برگزیده شده باشد، نیز بسیار دور از ذهن می‌نماید به این دلیل که این ژن یکی از اجزای اصلی مسیر سیگنالینگ Ras می‌باشد (۶۵) و حتی مکان‌های چسبیدن یکی از اجزای اصلی Ras (AP-1) در پروموتور این ژن به درستی یافت شده است.

علی‌رغم اینکه در برخی مقالات ذکر شده است که این ژن توسط مسیر سیگنالینگ Wnt نیز فعال می‌شود (۶۲)، در این مطالعه مشاهده شد که این پروموتور در رده سلولی SW480 که در آن مسیر سیگنالینگ Wnt فعال است موجب بیان چندان بالایی از ژن گزارشگر نشده است.

برخی مباحث در مورد حالت پلاستیسیته سلول‌های سرطانی وجود دارد که ذکر می‌کند زیر کلون‌هایی از یک سلول سرطانی می‌توانند به صورت یکی در میان دارای بیان کم یا زیاد یک پروتئین همچون UPAR باشند (۶۶). هم‌چنین در مقالات دیگری درباره بیان متغیر UPAR در یک رده سلولی بحث شده است حتی یانگ و همکاران (۶۷) نشان داده‌اند که در یک رده سلولی که دارای بیان کم این ژن می‌باشد؛ در شرایط خاص دیگری بیان بالاتری از این ژن دیده می‌شود و بر عکس. نکات فوق می‌تواند در مورد سلول‌های ما هم صادق باشد که به خاطر اینکه این سلول‌ها در یک شرایط پایدار قرار گرفته‌اند و نیازی به متاستاز یا حرکت و نفوذ از سدهای خارج سلولی ندارند و در نتیجه در برابر محرک‌های بیرونی از سدهای خارج سلولی قرار نمی‌گیرند، بیان این ژن نیز کم شده باشد. احتمال این می‌رود که اگر شرایط بیرونی سلول‌ها را تغییر دهیم، بیان این پروتئین نیز بالاتر رود و در نتیجه پروموتور آن فعال‌تر شود. همان‌طور که در مقدمه این مقاله ذکر شده است (۶۸) چسبیدن لیگاند‌های مختلف به گیرنده‌ای چون UPAR باعث افزایش بیان این ژن می‌شود؛ در نتیجه می‌توان گفت که بیان آن تحت تاثیر شرایط محیطی قرار دارد. چون سلول‌های مورد مطالعه ما در شرایط پایداری قرار داشته‌اند، سیگنال‌های فعال کننده متاستاز و حرکتشان فعال نبوده

Sea region of Iran: spatial analysis of cancer registry data. BMC Cancer. 2008; 8: 137.

2. Sadjadi A, Nourai M, Mohagheghi MA, Mousavi-Jarrah A, Malekezadeh R, Parkin DM. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. Asian Pac J Cancer Prev. 2005; 6(3): 359-363.

3. Giovannucci E. Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003; 12(2): 173-182.
4. Sodeifi N, Sotoudeh M, Shafieyan S. Immunohistochemical and Tissue Array Study for Comparison of the Expression of Tumor Suppressor Genes and with Intercellular Adhesive Molecules in Colorectal Adenocarcinoma and Nontumoral Colon. *Yakhteh*. 2006; 8(3): 178-183.
5. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th edition. New York: Garland Science. 2008.
6. Kolligs FT, Bommer G, Goke B. Wnt/beta-catenin/TCF signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002; 66(3): 131-144.
7. Yi H, Nakamura RE, Mohamed O, Dufort D, Hackam AS. Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(12): 5733-5741.
8. Mohamed AO. Expression and Estradiol Regulation of Wnt Genes in the Mouse Blastocyst Identify a Candidate Pathway for Embryo-Maternal Signaling at Implantation. *Yakhteh*. 2005; 7, suppl 1.
9. Wong CM, Fan ST, Ng IO. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*. 2001; 92(1): 136-145.
10. Al-Aynati MM, Radulovich N, Riddell RH, Tsao MS. Epithelial-cadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(4): 1235-1240.
11. Smalley MJ, Dale TC. Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001; 6(1): 37-52.
12. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(7): 3046-350.
13. Barker N, Morin PJ, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling. *Adv Cancer Res*. 2000; 77: 1-24.
14. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev*. 1996; 59(1): 3-10.
15. Armstrong DD, Esser KA. Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289(4): C853-C859.
16. Bohm J, Sustmann C, Wilhelm C, Kohlhase J. SALL4 is directly activated by TCF/LEF in the canonical Wnt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 348(3): 898-907.
17. Pishvaian MJ, Byers SW. Biomarkers of WNT signaling. *Cancer Biomark*. 2007; 3(4-5): 263-274.
18. Restucci B, Maiolino P, Martano M, Esposito G, De FD, Borzacchiello G, et al. Expression of beta-catenin, E-cadherin and APC in canine mammary tumors. *Anticancer Res*. 2007; 27(5A): 3083-3089.
19. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev*. 2002; 16(16): 2058-2072.
20. Lee EO, Shin YJ, Chong YH. Mechanisms involved in prostaglandin E2-mediated neuroprotection against TNF-alpha: possible involvement of multiple signal transduction and beta-catenin/T-cell factor. *J Neuroimmunol*. 2004; 155(1-2): 21-31.
21. Cervello M, Giannitrapani L, Labbozzetta M, Notarbartolo M, D'Alessandro N, Lampiasi N, et al. Expression of WISPs and of their novel alternative variants in human hepatocellular carcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1028: 432-439.
22. Shu W, Guttentag S, Wang Z, Andl T, Ballard P, Lu MM, et al. Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung. *Dev Biol*. 2005; 283(1): 226-239.
23. Shimokawa T, Furukawa Y, Sakai M, Li M, Miwa N, Lin YM, et al. Involvement of the FGF18 gene in colorectal carcinogenesis, as a novel downstream target of the beta-catenin/T-cell factor complex. *Cancer Res*. 2003; 63(19): 6116-6120.
24. Sonvilla G, Allerstorfer S, Stattner S, Karner J, Klimpfing M, Fischer H, et al. FGF18 in Colorectal Tumour Cells: Autocrine and Paracrine Effects. *Carcinogenesis*. 2007; 29(1): 15-24.
25. Haque T, Nakada S, Hamdy RC. A review of FGF18: Its expression, signaling pathways and possible functions during embryogenesis and post-natal development. *Histol Histopathol*. 2007; 22(1): 97-105.
26. Yamashita N, Minamoto T, Ochiai A, Onda M, Esumi H. Frequent and characteristic K-ras activation in aberrant crypt foci of colon. Is there preference among K-ras mutants for malignant progression? *Cancer*. 1995; 75 Suppl 6: 1527-1533.
27. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(14): 1062-1074.
28. Duursma AM, Agami R. Ras interference as cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13(4): 267-273.
29. Liu XL, Dai CC, Miao Y, Du JH, Zhang ZS, Chen SZ. Detection of k-ras gene point mutation in fine needle aspiration and pancreatic juice by sequence special primer method and its clinical significance. *World J Gastroenterol*. 2000; 6(6): 917-919.
30. Vatan O, Bilaloglu R, Tunca B, Cecener G, Gebitekin C, Egeli U, et al. Low frequency of p53 and k-ras codon 12 mutations in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) tumors and surgical margins. *Tumori*. 2007; 93(5): 473-7.
31. Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal*. 2002; 14(8): 649-654.
32. Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, Ogunfusika MO, Oser SM, Khan MA, et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer*. 1998; 78(2): 233-239.
33. Pollock CB, Shirasawa S, Sasazuki T, Kolch W, Dhillon AS. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2005; 65(4): 1244-1250.
34. Wu M, Huang C, Li X, Li X, Gan K, Chen Q, et al. LRRc4 inhibits glioblastoma cell proliferation, migration,

- and angiogenesis by downregulating pleiotropic cytokine expression and responses. *J Cell Physiol.* 2008; 214(1): 65-74.
35. Mesa C Jr, Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res.* 2006; 66(13): 6521-6529.
36. Backlund MG, Mann JR, Wang D, Dubois RN. Ras up-regulation of cyclooxygenase-2. *Methods Enzymol.* 2005; 407: 401-410.
37. Allgayer H, Wang H, Shirasawa S, Sasazuki T, Boyd D. Targeted disruption of the K-ras oncogene in an invasive colon cancer cell line down-regulates urokinase receptor expression and plasminogen-dependent proteolysis. *Br J Cancer.* 1999; 80(12): 1884-1891.
38. Rosenberg S. New developments in the urokinase-type plasminogen activator system. *Expert Opin Ther Targets.* 2001; 5(6): 711-722.
39. Barinka C, Parry G, Callahan J, Shaw DE, Kuo A, Bdeir K, et al. Structural basis of interaction between urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *J Mol Biol.* 2006; 363(2): 482-495.
40. Al-Atrash G, Kitson RP, Xue Y, Mazar AP, Kim MH, Goldfarb RH. uPA and uPAR contribute to NK cell invasion through the extracellular matrix. *Anticancer Res.* 2001; 21(3B): 1697-1704.
41. Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK, Christensen L, Blaakaer J, Bock JE, et al. The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res.* 2004; 24(3b): 1981-1985.
42. Akahane T, Ishii M, Ohtani H, Nagura H, Toyota T. Stromal expression of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) is associated with invasive growth in primary liver cancer. *Liver.* 1998; 18(6): 414-419.
43. Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, Kumar R. LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer.* 2006; 118(11): 2703-2710.
44. Cantero D, Friess H, Deflorin J, Zimmermann A, Brundler MA, Riesle E, et al. Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer.* 1997; 75(3): 388-395.
45. Albo D, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 up-regulates tumor cell invasion through the urokinase plasminogen activator receptor in head and neck cancer cells. *J Surg Res.* 2004; 120(1): 21-26.
46. D'Alessio S, Margheri F, Pucci M, Del RA, Monia BP, Bologna M, et al. Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase-plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice. *Int J Cancer.* 2004; 110(1): 125-133.
47. Lee KH, Bae SH, Lee JL, Hyun MS, Kim SH, Song SK, et al. Relationship between urokinase-type plasminogen receptor, interleukin-8 gene expression and clinicopathological features in gastric cancer. *Oncology.* 2004; 66(3): 210-217.
48. Ahmed N, Oliva K, Wang Y, Quinn M, Rice G. Down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor expression inhibits Erk signalling with concomitant suppression of invasiveness due to loss of uPAR-beta1 integrin complex in colon cancer cells. *Br J Cancer.* 2003; 89(2): 374-384.
49. Stephens RW, Nielsen HJ, Christensen IJ, Thorlacius-Ussing O, Sorensen S, Dano K, et al. Plasma urokinase receptor levels in patients with colorectal cancer: relationship to prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(10): 869-874.
50. Bauer TW, Fan F, Liu W, Johnson M, Parikh NU, Parry GC, et al. Insulinlike growth factor-I-mediated migration and invasion of human colon carcinoma cells requires activation of c-Met and urokinase plasminogen activator receptor. *Ann Surg.* 2005; 241(5): 748-756.
51. Rajesh D, Schell K, Verma AK. Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. *Mol Pharmacol.* 1999; 56(3): 515-525.
52. Dihlmann S, Klein S, Doeberitz Mv MK. Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther.* 2003; 2(6): 509-516.
53. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning a laboratory manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
54. Azadmanesh K, Rohvand F, Amini S, Arashkiya A, Kazanjy M. Evaluation of Stimulatory Effects of HTLV-I Tax Protein on CREB and NFkB Related Signaling Pathways Two B-Glycosidase Based Reporter Plasmids. *Yakhteh.* 2005; 6(24): 218-225.
55. Bessard A, Fremin C, Ezan F, Coutant A, Baffet G. MEK/ERK-dependent uPAR expression is required for motility via phosphorylation of P70S6K in human hepatocarcinoma cells. *J Cell Physiol.* 2007; 212(2): 526-536.
56. Borgatti M, Boyd DD, Lampronti I, Bianchi N, Fabbri E, Saviano M, et al. Decoy molecules based on PNA-DNA chimeras and targeting Sp1 transcription factors inhibit the activity of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) promoter. *Oncol Res.* 2005; 15(7-8): 373-383.
57. Dang J, Boyd D, Wang H, Allgayer H, Doe WF, Wang Y. A region between -141 and -61 bp containing a proximal AP-1 is essential for constitutive expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem.* 1999; 264(1): 92-99.
58. Li CY, Tan L, Zhang GJ, Li P, Tong C, Fan J, et al. Transcriptional regulation of urokinase receptor in high- (95D) and low-metastatic (95C) human lung cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2004; 36(6): 405-411.
59. Lengyel E, Wang H, Stepp E, Juarez J, Wang Y, Doe W, et al. Requirement of an upstream AP-1 motif for the constitutive and phorbol ester-inducible expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *J Biol Chem.* 1996; 271(38): 23176-23184.
60. Jamaluddin MS. Aspirin upregulates expression of urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) gene in human colon cancer cells through AP1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348(2): 618-627.
61. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human

- colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(4): 1603-1608.
62. Koch A, Waha A, Hartmann W, Hrychuk A, Schuller U, Waha A, et al. Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastomas. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(12): 4295-4304.
63. Soravia E, Grebe A, De LP, Helin K, Suh TT, Degen JL, et al. A conserved TATA-less proximal promoter drives basal transcription from the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*. 1995; 86(2): 624-635.
64. Luchtenborg M, Weijnenberg MP, Wark PA, Saritas AM, Roemen GM, van Muijen GN, et al. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*. 2005; 5: 160.
65. Muller SM, Okan E, Jones P. Regulation of urokinase receptor transcription by Ras- and Rho-family GTPases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 270(3): 892-898.
66. Laug WE, Wang K, Mundi R, Rideout W, III, Kruithof EK, Bogenmann E. Clonal variation of expression of the genes coding for plasminogen activators, their inhibitors and the urokinase receptor in HT1080 sarcoma cells. *Int J Cancer*. 1992; 52(2): 298-304.
67. Yang L, Avila H, Wang H, Trevino J, Gallick GE, Kitadai Y, et al. Plasticity in urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) display in colon cancer yields metastable subpopulations oscillating in cell surface uPAR density--implications in tumor progression. *Cancer Res*. 2006; 66(16): 7957-7967.
68. Mahanivong C, Yu J, Huang S. Elevated urokinase-specific surface receptor expression is maintained through its interaction with urokinase plasminogen activator. *Mol Carcinog*. 2007; 46(3): 165-175.

Studying the Activity of Fibroblast Growth Factor 18 and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Promoters in Two Colon Cancer Cell Lines

Ladan Teimoori-Toolabi, M.D.¹, Kayhan Azadmanesh, M.D., Ph.D.², Somayeh Jamali, B.Sc.¹, Amir Amanzadeh, D.V.M.³, Morteza Karimipoor, M.D., Ph.D.¹, Sirous Zeinali, Ph.D.^{1*}

1. Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Hepatitis and AIDS Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. National cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 13169-43551, Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: sirouszeinali@yahoo.com

Received: 28/Jun/2008, Accepted: 27/Dec/2008

Abstract

Introduction: Wnt and k-ras are two main signaling pathways activated in colon cancer. Many genes are upregulated downstream of these signaling pathways. The aim of this study was to assess the activity of Wnt and k-ras in HCT116 and SW480 cell lines by making two reporter constructs using promoters downstream of these pathways (fibroblast growth factor18 [FGF18] and urokinase plasminogen activator receptor [UPAR]).

Materials and Methods: UPARLacZ, FGF18LacZ, negative (pUCLacZ) and positive (CMV-LacZ) control plasmids and pRc/CMV2CAT were constructed. Expressions of LacZ in both cell lines were studied by β gal staining and ELISA after normalization with CAT expression.

Results: In both cell lines, FGF18LacZ transfected cells stained more than UPARLacZ transfected ones. This difference was more prominent in SW480. Both constructs have the ability of expression in both cell lines. It was also proven that FGF18LacZ was significantly more active than UPARLacZ in both cell lines. Expression of FGF18LacZ in HCT116 and SW480 cell lines was respectively 1.34 and 4.4 times more than UPARLacZ.

Conclusion: Despite the fact that in HCT116 the Ras pathway is activated, FGF18LacZ is more active than UPARLacZ although the UPAR promoter is more active in HCT116 cell line than SW480 cell line. These findings are in accordance with previous studies that in all colon cancer cell lines Wnt signaling pathway is active even though there is no mutation in any part of it. Wnt is the main signaling pathway responsible for carcinogenesis in colon epithelial cells. These constructs can be used as reporters for studying the above mentioned signaling pathways in other cell lines.

Keywords: Colon, Neoplasm, Urokinase Plasminogen Activator Receptor, Fibroblast Growth Factor 18, Promoter Regions

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 142-153