بررسی بیان گیرنده های نوروتنسین در رده های سلولی سرطان تخمدان

فاطمه قائمی منش[۱]، حجت اله ربانی[۲،*]، غلامرضا احمدیان[۳،*]، امیر حسن زرنانی[۴و۵]، مهرداد بهمنش[۱]، مریم هرمزی[۶]

[۱]تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی

[۲]تهران، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، پژوهشکده آنتی بادی منوکلونال

[۳]تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک مولکولی

[۴]تهران، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی

[۵]تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات ایمونولوژی

[۶]تهران، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل

چکیده

به دلیل تشخیص دیر هنگام سرطان تخمدان و عدم شیوه های درمانی مؤثر، این بیماری از نظر تلفات در بین سرطان های زنان بیشترین مرگ و میر را دارد. نوروتنسین یک پپتید مغزی و گوارشی است که از طریق تعامل با رسپتورهای ویژه، عملکردهای مرکزی و محیطی زیادی را در مغز، لوله گوارش و سیستم قلبی عروقی انجام می دهد. این پپتید عصبی که به عنوان هورمون سیستم محیطی نیز به شمار می رود، سبب رشد بافت ارگان هایی همانند پانکراس، معده، روده کوچک و کولون شده و اخیراً به عنوان فاکتور رشد سرطان معرفی شده است. نوروتنسین پیام رشد سلولی را از طریق اتصال به سه گیرنده با نام های NTR1 ، NTR2 و NTR3/sortilin به سلول هدف القاء می کند. در این مطالعه، بیان گیرنده های نوروتنسین در رده های سرطانی و بافت طبیعی تخمدان، توسط روش RT-PCR در سطح ژن توسط پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید. نتایج، حاکی از بیان رونوشت دو گیرنده NTR1 و NTR3/sortilin در ۵ رده سرطان تخمدان و عدم بیان آن در بافت طبیعی تخمدان می باشد، در حالی که رونوشت NTR2 در هیچ کدام بیان نمی شود. امروزه امکان تشکیل هترودایمر بین NTR1 و NTR3 جهت اتصال به نوروتنسین و وارد کردن آن به سلول در مقالات منتشر شده کاملاً به اثبات رسیده است لذا می توان وجود چنین مکانیسمی را در پیام رسانی نوروتنسین به سلول های سرطانی تخمدان نیز پیش بینی کرد که البته نیاز به مطالعات بیشتر دارد. به نظر می رسد از نابجا بیان شدن ملکول های NTR1 و NTR3 بتوان در تشخیص مولکولی و نیز درمان سرطان تخمدان بهره جست.

واژه های کلیدی: سرطان تخمدان، نوروتنسین، NTR1، NTR2، NTR3، Sortilin

* نویسندگان مسئول، تلفن : ۰۲۱-۲۲۴۳۱۹۴۹ و ۴۴۵۸۰۳۵۱ پست الکترونیکی: hodrab@gmail.com & ahmadian@nigeb.ac.ir

مقدمه

سرطان تخمدان از نظر تلفات در بین سرطان های زنان جایگاه نخست را داراست. به دلیل فقدان مارکر توموری ویژه بمنظور تشخیص زود هنگام این نوع سرطان، تشخیص بیماری در مراحل پیشرفته آن صورت می گیرد که همین امر به تلفات زیاد آن منجر می شود. اگر چه افزایش میزان بیان CA125 به تشخیص بیماری کمک می کند اما این مارکر عموماً در مراحل پیشرفته بیماری افزایش یافته و در دیگر بیماری های زنان نیز معمولاً افزایش می یابد (۴). لذا این مولکول، مارکراختصاصی برای تشخیص سرطان تخمدان نیست. از سوی دیگر

Archive of SID

www.SID.ir

علارغم درمان اولیه، در ۴۰ تا ۸۵ درصد بیمارانی که در مراحل II تا IV پیشرفتگی بیماری مراجعه می کنند، بیماری بازگشت می کند. در این موارد بسته به زمان عودت بیماری، از دوزهای بالاتر دارویی و گاهی جراحی مجدد برای درمان استفاده می کنند. با این حال این درمان ها در موارد کمی به نجات بیمار منجر می شود (۲۸). لذا همواره تلاش برای کشف روشهای مؤثرتر در تشخیص و نیز درمان بیماری سرطان تخمدان ادامه دارد.

نوروتنسین یک پپتید مغزی و گوارشی است که از طریق تعامل با رسپتورهای ویژه، عملکردهای مرکزی و محیطی زیادی را در مغز، لوله گوارش و سیستم قلبی عروقی انجام می دهد(۲۹). این پپتید ۱۳ آمینواسیدی اولین بار توسط کاراوای و لیمن در سال ۱۹۷۳ از هیپوتالاموس گوساله جدا شد (۵). نوروتنسین سبب رشد بافت ارگان هایی همانند پانکراس، معده، روده کوچک و کولون شده و اخیراً به عنوان فاکتور رشد سرطان نیز شناخته شده است(۷).

تا کنون سه گیرنده پروتئینی برای نوروتنسین شناخته شده است که دو تای آنها با نام های Neurotensin Receptor1 (NTR1) و Neurotensin Receptor 2 (NTR2) متعلق به خانواده گیرنده های متصل به G– پروتئین ها هستند که چندین مسیر پیام رسانی را در سلول راه اندازی می کنند (۲۹). در حالی که سومی با نام sortilin یا Neurotensin Receptor 3 (NTR3) پروتئینی به وزن ۱۰۰ کیلو دالتون بوده که تنها یک بار از غشاء عبور کرده و به تازگی به عنوان گیرنده نوروتنسین شناخته شده است (۱۹).

بالاترین تمایل اتصال به نوروتنسین متعلق به گیرنده NTR1 می باشد که ژن کدکننده آن در انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲۰ (۲۰q۱۳. ۳۳) واقع شده است و رونوشتی به طول ۴۱۵۸ نوکلئوتید را کد می کند که حاصل ترجمه آن پروتئینی به طول ۴۱۸ آمینو اسید می باشد (۲۹). پروتئین NTR1 تمایل بالایی (K_d = ۰/۵۶ ± ۰/۱ nmol/L) نسبت به نوروتنسین داشته و از طریق اتصال به G– پروتئین ها(G-protein) در انتقال بسیاری از پیام های داخل سلولی نقش دارد (۳).NTR1 منجر به تحریک IP3 و رها سازی Ca^{2+} شده و به دلیل فعال سازی MAP کینازها در پیام تقسیم سلولی نقش دارد. از دیگر فعالیت های این پروتئین کمک به تشکیل cAMP، فعال سازی فسفولیپاز C و فعال سازی یا بازدارندگی پروتئین کینازهای ERK1/2 ، JNK و Akt می باشد (۹و۲۰).

NTR2 دیگر گیرنده نوروتنسین بوده که تمایل کمتری (K_d = ۳/۷ ± ۰/۲ nmol/L) برای اتصال به نوروتنسین داشته (۳) و توسط ژنی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲ (۲p۲۵. ۱) رمز گزاری می شود. این رونوشت۱۶۲۲ نوکلئوتیدی پروتئینی به طول ۴۱۰ آمینو اسید را کد می کند که حدوداً ۳۸ درصد با پروتئین NTR1 شباهت نشان میدهد (۲۹). مسیر پیام رسانی نوروتنسین که با واسطه NTR2در سلول راه اندازی می شود به صورت دقیق مشخص نیست و احتیاج به مطالعات بیشتر دارد (۹).

NTR3/sortilin یک پروتئین چند عملکردی با قابلیت اتصال به چندین لیگاند می باشد که وظیفه اتصال به نوروتنسین و به درون وارد کردن (internalize) آن را به کمک تشکیل هترودایمر با دیگر گیرنده های نوروتنسین بر عهده دارد (۲۶). ژن رمز کننده NTR3/sortilin با نام *SORT1* در انسان دارای ۲۲ اگزون بوده و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱، نزدیک به سانترومر (۱p۲۱. ۳–p۱۳. ۱) واقع شده است. این ژن رونوشتی به طول ۷۰۱۸ نوکلئوتید را رمز می کند که پروتئینی با ۸۳۱ آمینواسید از روی آن ترجمه می شود(NCBI, Map Viewer) .

امروزه نقش نوروتنسین به عنوان فاکتور رشد در تعداد زیادی از سلول های رده های سرطانی انسانی با منشأ پانکراس (۳۱)، پروستات(۲۴) و کولون(۱۱) ،(۱۴) به اثبات رسیده است، لذا مطالعات زیادی در جهت بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

بیان گیرنده های این پپتید در تومورهای انسانی و رده های سرطانی با هدف شناخت مکانیسم عملکرد آن، به امید کمک به درمان بدخیمی ها انجام شده است. در مطالعه قبلی (۱۳) که در این گروه تحقیقاتی انجام گردید، بیان نابجای (ectopic) گیرنده NTR3/sortilin در بافت سرطان تخمدان و عدم بیان آن در بافت طبیعی تخمدان در هر دو سطح ژن و پروتئین، برای اولین بار نشان داده شد. در مطالعه حاضر به بررسی بیان هر سه گیرنده نوروتنسین در رده های سلولی سرطان تخمدان و مقایسه آن با بافت طبیعی تخمدان توسط روش RT-PCR پرداخته شد.

مواد و روشها

۱- سلول های سرطانی مورد مطالعه و کشت آنها: در این مطالعه از ۵ رده سلولی سرطان تخمدان استفاده شد. رده های سلولی Caov-4 (ATCC Code: HTB-76)، SKOV-3 (ATCC Code: HTB-77)و OVCAR-3 (ATCC Code: HTB-161) از American Type Culture Collection خریداری شد. رده های سلولی A2780S (NCBI Code: C461) و 2008/C13.R (NCBI Code: C446) از بانک سلولی پاستور خریداری گردید. رده سلولی سرطان پروستات با نام PC-3 (ATCC Code: CRL-1435)به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR ژن های NTR1 و NTR3/sortilin ، و رده سلولی سرطان پروستات با نام LnCaP (ATCC Code: CRL-1740) به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR ژن NTR2 مورد استفاده قرار گرفت که هر دو از American Type Culture Collection خریداری شدند. برای کشت این سلول ها از محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, USA) و سرم جنین گاوی (FBS)(Biochrom AG, Berlin, Germany) به میزان ۱۰ درصد، پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. سلول ها در فلاسک های T25 و در انکوباتور کشت سلولی با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و میزان ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند.

بافت طبیعی تخمدان: بافت طبیعی تخمدان از سه خانم ۲۳ تا ۳۸ ساله که جهت تغییر جنسیت (sex reversal) یا جراحی کیست تخمدان به بیمارستان امام خمینی مراجعه کرده بودند تهیه شد. جهت نمونه گیری، موافقت کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه ابن سینا اخذ شد و کلیه بیماران قبل از نمونه گیری، رضایتنامه کتبی را آگاهانه امضا کردند. قابل ذکر است که هیچ یک از افراد به اندومتریوز یا بیماری های تخمدان مبتلا نبودند.

واکنش RT-PCR

استخراج RNA و ساخت cDNA : بمنظور انجام واکنش RT-PCR جهت بررسی بیان ژن های مورد نظر، ابتدا RNA تام از رده های سلولی و نسوج تخمدان سالم با استفاده از محلول RNA-Bee (BioSite, äby, Sweden) Tمطابق دستور کار شرکت استخراج شد و پس از بررسی کیفیت RNA استخراج شده توسط الکتروفورز ژل آگارز و انجام UV اسپکتروفوتومتری، cDNA ساخته شد. ابتدا بمنظور واسرشت تاخوردگی های RNA، میزان ۲ میکروگرم از RNA ی تام، با آب مقطر استریل تا حجم ۱۰ میکرولیتر رقیق شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه گردید و پس از انتقال بر روی یخ، ۴ میکرولیتر بافرتکثیر ۵X (Fermentas, Germany) ، ۲میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار (Roche, Germany)، ۲میکرولیتر Random Hexamer (N6) (Roche, Germany)(۱۰ pmol/µl)، ۱میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (20U/µl) (Fermentas, Germany) M-MuLV و مقدار مناسب آب مقطر استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر به آن اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت و سپس در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. قابل ذکر است

Archive of SID

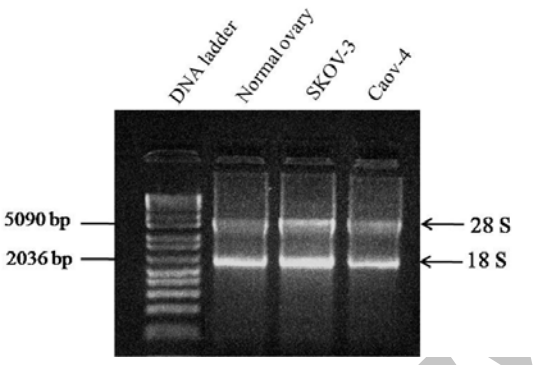
www.SID.ir

cDNA های ساخته شده از RNA استخراج شده از نسوج تخمدان سالم، پس از بررسی کیفیت و صحت درستی ساخته شدن، با یکدیگر مخلوط (pooled) شده و در آزمایشات PCR به صورت یک نمونه واحد مورد ارزیابی قرار گرفت.

پرایمرها: با استفاده از نرم افزار Gene Runner و با در نظر گرفتن اصول طراحی پرایمر، پرایمرها طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت (MWG, Koln, Germany) Operon و با درجه خلوص (High Purified Salt Free) HPSF ساخته شد. اتصال کلیه پرایمرها به ژنوم انسان توسط جستجو با نرم افزار کاوش (Blast) انجام شد تا از تک بودن محل جفت شدن پرایمر ها اطمینان حاصل شود. نتایج جستجو در ژنوم، نشان داد که کلیه پرایمرها دارای محل اتصال منحصر به فردی هستند. در این تحقیق، ژن β-actin به عنوان کنترل داخلی (internal control) انتخاب و از توالی پرایمر های مطرح شده در مقاله Kreuzer و همکاران (۱۵) استفاده شد. توالی پرایمر ها در جدول ۱ ذکر گردیده است.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر تکثیر ۱۰X (Roche, Germany)، ۱میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی مولار (در مورد NTR3 مقدار $MgCl_2$ ۳ میکرولیتر بود)(Roche, Germany)، ۱میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای بالادست(Forward) و پایین دست(Reverse) ۱۰ pmol/µl (Operon, Koln,Germany) با مشخصات ذکر شده در جدول یک، یک واحد آنزیم Taq DNA پلیمراز (Roche, Germany)، و مقدار مناسب آب مقطر استریل تا حجم ۲۴ میکرولیتر بود. یک میکرولیتر از محصول واکنش RT به عنوان الگو به مخلوط واکنش اضافه گردید.

بمنظور انجام واکنش PCR، نمونه ها در مرحله اول به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمال سایکلر انکوبه شدند. در مرحله دوم، ۳۴ چرخه شامل واسرشت سازی (Denaturation) (۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه)، اتصال (Annealing) (۶۰ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه) و طویل سازی (Extension) (۷۲ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه) انجام شد. در مرحله سوم، چرخه طویل سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی گراد) به مدت ۷ دقیقه اجرا و محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. تعداد چرخه های PCR برای ازدیاد ژن β-actin، تعداد ۲۵ چرخه بود.



شکل۱- بررسی کیفی RNA استخراج شده از یکی از بافت های طبیعی تخمدان و رده های سلولی Caov-4 و SKOV-3.

نتایج

RT-PCR : جهت انجام واکنش RT-PCR، RNA تام از سلولها استخراج شده و کیفیت RNA به دست آمده به کمک الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید(شکل ۱). در بررسی ژل، دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) دیده می شود که مؤید عدم تجزیه RNA است. جهت بررسی کیفیت cDNA ساخته شده از RNA ، از PCR ژن β-actin به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (شکل ۲). بمنظور انتخاب نمونه هایی با کیفیت بالاتر، تعداد چرخه های واکنش PCR ژن housekeeping، ۲۵ چرخه تنظیم گردید. مقدار ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به

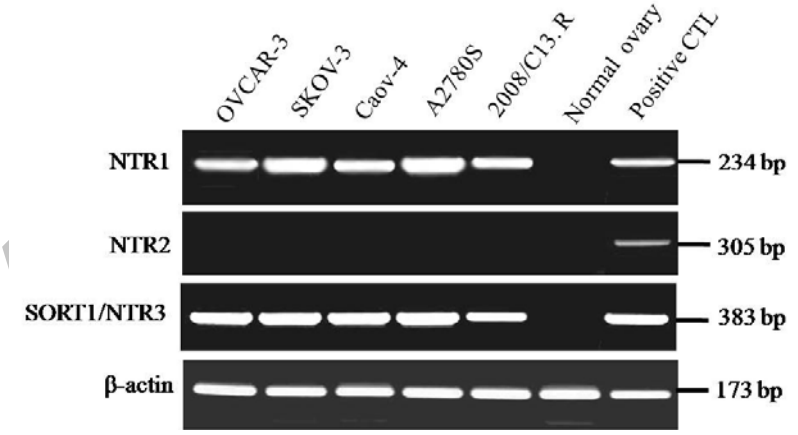
Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر قطعه β-actin با پرایمرهای اختصاصی، بر روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ لود شد. همان طور که انتظار می رفت قطعه ۱۷۳ bp در مقایسه با سایز مارکر ۱ Kb (Invitrogen, USA) مشهود بود. پس از اطمینان از تکثیر قطعه ژن housekeeping، بررسی بیان ژن NTR1 در نمونه ها، توسط پرایمرهای اختصاصی با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام گرفت. حاصل الکتروفورز محصول PCR باند ۲۳۴ bp بر روی ژل آگارز بود. نتیجه حاصل از تکثیر این ژن، نشان می داد که بیان NTR1 در رده های سرطان تخمدان صورت می گیرد در صورتیکه در نمونه طبیعی تخمدان بیان نمی شود (شکل ۲). بررسی بیان ژن NTR3 توسط پرایمر های اختصاصی، حاکی از بیان این ژن توسط تکثیر قطعه ای به طول ۳۸۳ bp در نمونه های رده های سرطان تخمدان بود.

جدول ۱- اسامی ژن ها و توالی پرایمر های مورد استفاده در واکنش RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمر ها	اندازه (bp)
NTR1 (NM 002531.2)	Forward: 5′-CAAGGTCGTCATACAGGTCAACAC-3′ Reverse: 5′-GCGATGACCACTGCACGTAGGAC-3′	234
NTR2 (NM 012344.3)	Forward: 5′-CCAAGTCTTTATCCAGGTGAATGTG-3′ Reverse: 5′-ATGACCACGATGGCTCTGAGAACC -3′	305
SORT1(NTR3) (NM 002959.4)	Forward: 5′-CAGTCCAAGCTATATCGAAGTGAGG-3′ Reverse: 5′-AAGATGGTGTTGTCTGATCCCCATTT-3′	383
β-actin	Forward: 5′-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3′ Reverse: 5′-CTGGTGCCTGGGGCG-3′	173



شکل۲- بررسی بیان گیرنده های نوروتنسین در ۵ رده سرطان تخمدان و بافت طبیعی تخمدان (مخلوط ۳ cDNA) توسط روش RT-PCR. رونوشت های NTR1 و NTR3 در همه رده های سلولی سرطان تخمدان بیان می شوند در حالیکه در بافت طبیعی تخمدان وجود ندارد. رونویسی از رونوشت NTR2 در هیچ یک از رده های سلولی سرطان تخمدان و نیز بافت طبیعی تخمدان صورت نمی گیرد. بیان ژن β-actin به عنوان کنترل داخلی بررسی شد. نمونه کنترل مثبت در بررسی بیان NTR1 و NTR3 ، cDNA ی رده سلولی PC-3 (سرطان پروستات)و در مورد NTR2 ، cDNA ی رده سلولی LnCaP (سرطان پروستات) می باشد.

www.SID.ir

این بررسی نشان می داد که ژن NTR3 در همه رده های سرطان تخمدان بیان می شود در حالیکه در نمونه طبیعی تخمدان که خود مخلوط ۳ نمونه مجزا می باشد بیان نمی شود (شکل ۲). همچنین در این مطالعه، بررسی بیان ژن NTR2 توسط تکثیر قطعه ای به طول bp ۳۰۵ انجام شد. همان طور که شکل ۲ نیز نشان می دهد ژن NTR2 در هیچ یک از نمونه های رده های سرطانی و طبیعی تخمدان بیان نمی شود.

بحث

در این تحقیق، بیان انواع گیرنده های نوروتنسین در رده های سرطان تخمدان مورد مطالعه و مقایسه با بافت طبیعی تخمدان قرار گرفت. با توجه به نقش گیرنده های پپتیدی سطح سلولی در تعیین سرنوشت سلول و نیز امکان هدف گیری مستقیم آن ها توسط لیگاند انتخابی شان، مطالعه این گیرنده ها در تحقیقات سرطان با هدف درمان بیماری بسیار جذاب و قابل توجه است (۱و۲۲). مطالعات بسیاری نشان می دهد که نوروتنسین از طریق بیان گیرنده هایش در بسیاری از سرطان ها پیام رشد را به تومور ارسال می کند (۷). اگر چه این سؤال هنوز پاسخ داده نشده است که آیا نوروتنسین به صورت اتوکرین (autocrine) یا پاراکرین (paracrine) بر روی رشد سلول های سرطانی عمل می کند. در برخی بافت های سرطانی مشتق شده از کولون (۱۱)، شش(۳۰)، پانکراس(۱۲) و پروستات (۲۳) نشان داده شده است که نوروتنسین بیان می شود. اما در مورد سرطان تخمدان گزارشی مبنی بر بررسی بیان نوروتنسین در این سلول ها در دست نیست، اگر چه داده ها نشان می دهد قطعه بزرگتر حاصل از شکستن نوروتنسین پس از هر وعده غذایی که نوروتنسین در روده تولید می شود به داخل جریان خون آزاد شده و بر بافت های محیطی (peripheral) اثر می گذارد (۶). تومور سرطان تخمدان هم می تواند تحت این مکانیسم متأثر از نوروتنسین باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه برای اولین بار نشان داد که ژن NTR1 به صورت نابجا در رده های سلولی سرطان تخمدان بیان شده در حالیکه در بافت طبیعی تخمدان بیان نمی شود. شواهد زیادی مبتنی بر افزایش بیانNTR1 در سلول های سرطانی مختلف به جز سرطان تخمدان، در دست می باشد (۲۵). Somaï و Elek در مطالعات جداگانه نشان دادند که NTR1 در بافت و رده های سلولی سرطان سینه افزایش بیان نشان می دهد (۱۰ و ۲۵). استفاده از آنتاگونیست های گیرنده NTR1 در مدل موشی (nude mice) که آدنوکارسینومای کولون به آن پیوند شده بود، باعث کاهش اندازه و رشد تومور گردید (۱۶).

از دیگر نتایج به دست آمده از این مطالعه همچون مطالعه قبلی ما (۱۳)، بیان نابجای(ectopic) NTR3/sortilin در رده های سلولی سرطان تخمدان و عدم بیان آن در بافت طبیعی تخمدان بود. در مطالعه ای که توسط Dal Farra و همکاران با هدف بررسی الگوی بیان گیرنده های نوروتنسین در چندین رده سرطانی مشتق از کولون، پروستات و پانکراس انجام گرفت، نشان داده شد که تنها گیرنده نوروتنسینی که در همه آن ها بیان می شود NTR3 است، در حالی که NTR1 در بعضی از آن ها بیان شده و NTR2 در هیچ کدام یافت نمی شود (۸). در تحقیق دیگری که بر روی چندین رده سرطان پروستات انجام شد، بیان NTR3 در همه آنها به اثبات رسید در حالیکه از نظر نویسنده این بیان همگانی دلیلی بر نقش حیاتی NTR3 در بقای سلول سرطانی و احتمالاً در رشد آن می باشد (۲۷).

در این مطالعه، بررسی بیان NTR2 برای اولین بار نشان داد که این ژن در هیچ کدام از رده های سرطانی و نیز بافت طبیعی تخمدان بیان نمی شود. این نتیجه مشابه داده های Dal Farra در بررسی الگوی بیان گیرنده های نوروتنسین در چندین رده سرطانی است (۸). عدم بیان NTR2 نشان دهنده این است که این گیرنده در اتصال به نوروتنسین و

Archive of SID

www.SID.ir

انتقال پیام آن به داخل سلول های سرطان تخمدان نقش ندارد.

اگر چه فرض بر آن است که بیشتر گیرنده های متصل به G- پروتئین به صورت منومر در سلول وجود دارند اما نتایج به دست آمده از بسیاری از مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی بحث می کنند که این گیرنده ها به صورت هومو یا هترومر و یا گاهی به صورت الیگومر هستند، که این برهمکنش ها برای عملکرد آنها لازم و مهم هستند(۲و۲۱). بررسی چگونگی بیان گیرنده های نوروتنسین در رده آدنوکارسینومای کولون با نام HT29 نشان داد که دو گیرنده NTR1 و NTR3 به طور همزمان در آن بیان شده و با یکدیگر تشکیل کمپلکس می دهند (۱۷). همچنین در این تحقیق اثبات گردید که برهم کنش NTR3 با NTR1 جهت تنظیم فسفریلاسیون MAP کینازها و فعال شدن فسفو اینوزیتید (PI3) در اثر القاء نوروتنسین در این سلول ها ضروری می باشد (۱۷). نتایج به دست آمده از RT-PCR در این مطالعه نیز حاکی از بیان همزمان دو گیرنده NTR1 و NTR3 در رده های سرطانی و عدم بیان آن ها در بافت طبیعی تخمدان می باشد. لذا می توان پیش بینی کرد که دو گیرنده مذکور در همکاری با یکدیگر و با تشکیل کمپلکس در اتصال به نوروتنسین و به درون کشیدن آن در سرطان تخمدان نقش داشته باشند. اگر چه برای اثبات این فرضیه انجام مطالعات بیوشیمیایی همچون بررسی برهمکنش نوروتنسین رادیواکتیو یا آنالوگ های آن، در مجاورت با رده سلولی و بافت سرطان تخمدان مورد نیاز می باشد. همچنین انجام آزمایشاتی همچون رسوب دادن کمپلکس پروتئینی NTR1-NTR3 با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی علیه آن دو (co-immunoprecipitation) می تواند همکاری این دو گیرنده را در تشکیل کمپلکس در تحقیقات آینده به اثبات برساند.

به طور کلی، چند ویژگی قابل توجه همچون بیان نابجای NTR1 و NTR3 در سرطان تخمدان، عدم بیان آن ها در تخمدان سالم و دخالت این گیرنده ها در رشد سلول های سرطانی با راه اندازی مسیر پیام رسانی ERK (۱۸و۲۰)، این مولکول ها را کاندید مناسبی جهت درمان بیماران مبتلا به کارسینومای تخمدان قرار می دهد. لذا در راستای این هدف، تولید آنتی بادی های مونوکلونال اختصاصی که قادر به پوشاندن مکان اتصال نوروتنسین در بخش خارج سلولی این گیرنده ها و جلوگیری از راه اندازی مسیر های درون سلولی القاء کننده رشد باشند پیشنهاد می شود.

منابع

1. Aina, O. H., Sroka, T. C., Chen, M. L., and Lam, K. S. (2002) Therapeutic cancer targeting peptides, *Biopolymers 66*, 184-199.

2. Bouvier, M. (2001) Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors, *Nat Rev Neurosci 2*, 274-286.

3. Chalon, P., Vita, N., Kaghad, M., Guillemot, M., Bonnin, J., Delpech, B., Le Fur, G., Ferrara, P., and Caput, D. (1996) Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin binding site, *FEBS Lett 386*, 91-94.

4. Cannistra, S. A. (2004) Cancer of the ovary, *N Engl J Med 351*, 2519-2529.

5. Carraway, R., and Leeman, S. E. (1973) The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami, *J Biol Chem 248*, 6854-6861.

6. Carraway, R. E., Mitra, S. P., and Spaulding, G. (1992) Posttranslational processing of the neurotensin/neuromedin-N precursor, *Ann N Y Acad Sci 668*, 1-16.

Archive of SID

www.SID.ir

7. Carraway, R. E., Plona, A. M. (2006) Involvement of neurotensin in cancer growth: evidence, mechanisms and development of diagnostic tools, *Peptides 27*, 2445-2460.

8. Dal Farra, C., Sarret, P., Navarro, V., Botto, J. M., Mazella, J., and Vincent, J. P. (2001) Involvement of the neurotensin receptor subtype NTR3 in the growth effect of neurotensin on cancer cell lines, *Int J Cancer 92*, 503-509.

9. Ehlers, R. A., Zhang, Y., Hellmich, M. R., and Evers, B. M. (2000) Neurotensin-mediated activation of MAPK pathways and AP-1 binding in the human pancreatic cancer cell line, MIA PaCa-2, *Biochem Biophys Res Commun 269*, 704-708.

10. Elek, J., Pinzon, W., Park, K. H., and Narayanan, R. (2000) Relevant genomics of neurotensin receptor in cancer, *Anticancer Res 20*, 53-58.

11. Evers, B. M., Ishizuka, J., Chung, D. H., Townsend, C. M., Jr., and Thompson, J. C. (1992) Neurotensin expression and release in human colon cancers, *Ann Surg 216*, 423-430.

12. Feurle, G. E., Helmstaedter, V., Tischbirek, K., Carraway, R., Forssmann, W. G., Grube, D., and Roher, H. D. (1981) A multihormonal tumor of the pancreas producing neurotensin, *Dig Dis Sci 26*, 1125-1133.

13. Hemmati, S., Zarnani, A. H., Mahmoudi, A. R., Sadeghi, M. R., Soltanghoraee, H., Akhondi, M. M., Tarahomi, M., Jeddi-Tehrani, M., and Rabbani, H. (2009) Ectopic Expression of Sortilin 1 (NTR-3) in Patients with Ovarian Carcinoma, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology (AJMB) 2*, 125-131.

14. Iwase, K., Evers, B. M., Hellmich, M. R., Kim, H. J., Higashide, S., Gully, D., and Townsend, C. M., Jr. (1996) Indirect inhibitory effect of a neurotensin receptor antagonist on human colon cancer (LoVo) growth, *Surg Oncol 5*, 245-251.

15. Kreuzer, K. A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., Pauli, G., Huhn, D., and Schmidt, C. A. (1999) Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference, *Clin Chem 45*, 297-300.

16. Maoret, J. J., Anini, Y., Rouyer-Fessard, C., Gully, D., and Laburthe, M. (1999) Neurotensin and a non-peptide neurotensin receptor antagonist control human colon cancer cell growth in cell culture and in cells xenografted into nude mice, *Int J Cancer 80*, 448-454.

17. Martin, S., Navarro, V., Vincent, J. P., and Mazella, J. (2002) Neurotensin receptor-1 and -3 complex modulates the cellular signaling of neurotensin in the HT29 cell line, *Gastroenterology 123*, 1135-1143.

18. Martin, S., Vincent, J. P., and Mazella, J. (2003) Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia, *J Neurosci 23*, 1198-1205.

19. Myers, R. M., Shearman, J. W., Kitching, M. O., Ramos-Montoya, A., Neal, D. E., and Ley, S. V. (2009) Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with the neurotensin receptors, *ACS Chem Biol 4*, 503-525.

20. Pelaprat, D. (2006) Interactions between neurotensin receptors and G proteins, *Peptides 27*, 2476-2487.

21. Prinster, S. C., Hague, C., and Hall, R. A. (2005) Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance, *Pharmacol Rev 57*, 289-298.

22. Reubi, J. C., Macke, H. R., and Krenning, E. P. (2005) Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future, *J Nucl Med 46 Suppl 1*, 67S-75S.

23. Seethalakshmi, L., Mitra, S. P., Dobner, P. R., Menon, M., and Carraway, R. E. (1997) Neurotensin receptor expression in prostate cancer cell line and growth effect of NT at

Archive of SID

www.SID.ir

physiological concentrations, *Prostate 31*, 183-192.

24. Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M., and Maihle, N. J. (1994) Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A 91*, 4673-4677.

25. Somaï, S., Gompel, A., Rostene, W., and Forgez, P. (2002) Neurotensin counteracts apoptosis in breast cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun 295*, 482-4.

26. Souaze, F., and Forgez, P. (2006) Molecular and cellular regulation of neurotensin receptor under acute and chronic agonist stimulation, *Peptides 27*, 2493-2501.

27. Swift, S. L., Burns, J. E., and Maitland, N. J. (2010) Altered expression of neurotensin receptors is associated with the differentiation state of prostate cancer, *Cancer Res 70*, 347-356.

28. Tinger, A., Waldron, T., Peluso, N., Katin, M. J., Dosoretz, D. E., Blitzer, P. H., Rubenstein, J. H., Garton, G. R., Nakfoor, B. A., Patrice, S. J., Chuang, L., and Orr, J. W. (2001) Effective palliative radiation therapy in advanced and recurrent ovarian carcinoma, *Int J Radiat Oncol Biol Phys 51*, 1256-1263.

29. Vincent, J. P., Mazella, J., and Kitabgi, P. (1999) Neurotensin and neurotensin receptors, *Trends Pharmacol Sci 20*, 302-309.

30. Wood, S. M., Wood, J. R., Ghatei, M. A., Lee, Y. C., O'Shaughnessy, D., and Bloom, S. R. (1981) Bombesin, somatostatin and neurotensin-like immunoreactivity in bronchial carcinoma, *J Clin Endocrinol Metab 53*, 1310-1312.

31. Yamada, M., Ohata, H., Momose, K., and Richelson, E. (1995) Pharmacological characterization of SR 48692 sensitive neurotensin receptor in human pancreatic cancer cells, MIA PaCa-2, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol 90*, 37-47.

Archive of SID

www.SID.ir

Expression profile of neurotensin receptors in ovarian cancer cell lines

Ghaemimanesh F.[1], Rabbani H.A.[2,] , Ahmadian Gh.R.[3,] , Zarnani A.H.[4,5], Behmanesh M.[1] and Hormozi M.[6]

[1] Genetics Dept., School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

[3] Molecular Genetics Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[4]Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

[5]Immunology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

[6]Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Ovarian cancer is the most common cause of death among the gynecologic malignancies. This outcome is due to the lack of tools for early detection and also effective therapeutic strategies. Neurotensin, is a neuromodulator of dopamine transmission and exerts potent hypothermic and analgesic effects in the brain, whereas in the periphery, neurotensin is a paracrine and endocrine hormone of the digestive tract and of the cardiovascular system. In addition, neurotensin has been shown to stimulate the growth of numerous gastrointestinal tissues including pancreas, gastric antrum, small bowel and colon. Interestingly, neurotensin also acts as a growth factor in a variety of human cancers. Neurotensin fulfills its central and peripheral function through its interaction with three specific receptors: NTR1, NTR2 and NTR3/sortilin. In this study we have investigated five human ovarian cancer cell lines as well as normal ovary tissues for expression of three neurotensin receptors using RT-PCR. We found that NTR1 and NTR3 were expressed in ovarian cancer cell lines while neither of them expressed in normal ovary. Neither of the normal ovary nor the ovarian cancer cell lines expressed NTR2 receptor. The heterodimerization of NTR1 and NTR3 has been shown to be necessary for internalization of neurotensin following activation of downstream signaling cascade. Therefore, we hypothesize that such co-expression of NTR1 and NTR3 might play a functional impact on tumorogenesis of ovarian carcinoma. Furthermore, such ectopic expression in ovarian carcinoma make them possible candidates for developing a more valued diagnostic tool and also possible therapeutic target in patients with ovarian carcinoma.

Keywords: Ovarian Cancer, Neurotensin, NTR1, NTR2, NTR3, Sortilin

Archive of SID

www.SID.ir