

## بررسی چگونگی بیان ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های دودمانی سرطان پروستات انسانی از نوع PC3 و DU145

زهرا سهیلی<sup>\*۱</sup>، زرین مینوچهر<sup>۲</sup>، شهرام سمیعی<sup>۳</sup>، زهرا عطایی<sup>۴</sup>، مهناز کواری<sup>۴</sup>، علی طالبیان<sup>۵</sup>

### خلاصه

**سابقه و هدف:** دو دودمان سلولی از سرطان پروستات، PC3 و DU-145، بسیار متاستاتیک هستند ولی از نظر بیان ژن سرکوب‌گر PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) مشابه نیستند. سلول‌های DU145، PTEN را بیان می‌کنند ولی سلول‌های PC-3 فاقد ژن PTEN هستند. محصول ژن عملکرد PI3K (phosphoinositide-3 kinase) را بی‌اثر می‌سازد. بیان افزایش یافته ژن PI3K موجب تخریب غشای پایه، نوزایی عروق و مهاجرت سلولی می‌گردد. هدف از این تحقیق بررسی و مقایسه الگوی بیان ایزوفورم‌های PI3K بین این دو نوع دودمان سلولی جهت یافتن دلیلی برای قدرت بالای متاستازی سلول‌های DU145 بوده است.

**مواد و روش‌ها:** محتوای RNA کل از هر دو نوع سلول استخراج گردید و mRNA مربوط به ایزوفورم‌های PI3K به وسیله روش RT-PCR با آنزیم‌های مختلف رونویسی معکوس و در شرایط متفاوت انکوباسیون بررسی گردید.

**نتایج:** داده‌ها نشان دادند هر دو نوع سلول زیر واحد کاتالیتیک P110 $\alpha$  و پروتئین p85 از دسته IA، ایزوفورم PI3K-C<sub>2</sub> را از دسته II و Vps34p را از دسته III خانواده ایزوفورم‌های PI3K بیان می‌کنند ولی از نظر نوع ایزوفورم‌های بررسی شده بین دو نوع سلول تفاوتی مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** از آنجا که برای سلول‌های DU145 در مقایسه با سلول‌های PC3 در الگوی بیان ایزوفورم‌های PI3K اختلافی مشاهده نشد، پیشنهاد می‌گردد به وسیله روش‌های کمی مقدار بیان هر یک از ایزوفورم‌ها تعیین شود. بدیهی است مشاهده هر گونه اختلاف در مقدار بیان ژن‌های تعیین شده می‌تواند به نوعی با قدرت تهاجمی سلول مرتبط باشد.

**واژگان کلیدی:** فسفاتیدیل اینوزیتول-3-کیناز (PI3K)، سرطان پروستات، دودمان سلولی

- ۱- استادیار گروه بیوشیمی پژوهشکده علوم پایه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
  - ۲- استادیار گروه فرآورده‌های بیولوژیک پژوهشکده صنعت و معدن پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
  - ۳- مسئول بخش کیت سازی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران.
  - ۴- کارشناس بخش کیت سازی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران.
  - ۵- معاونت فنی و کنترل کیفی، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران.
- \* نویسنده مسؤل: زهرا سهیلی.

آدرس: تهران، کیلومتر ۱۷ اتوبان تهران، کرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندس ژنتیک و زیست فناوری.

پست الکترونیک: Zahra@nrcgeb.ac.ir

تلفن: ۰۲۱ ۴۴۵۸۰۳۷۹

تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۶

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۵/۷/۱۶

دورنویس: ۰۲۱ ۴۴۵۸۰۳۹۹

### مقدمه

کنترل سرطان می‌باشند [۳]. سلول‌های سرطانی این توانایی را کسب می‌کنند که مرزهای بافتی را بشکنند و به بافت‌های مجاور و دور مهاجرت کنند. این فرآیند (متاستاز) بدترین وجه سرطان است [۴]. از میان انواع پروتئینازهایی که در توسعه تومورها دخالت دارند می‌توان از MMP ها (Matrix metalloproteinase) نام برد [۵، ۶]. مهار رگ‌زادایی و مهار تخریب غشای پایه و ماتریکس

سرطان پروستات شایع‌ترین نوع بدخیمی در مردان است و دومین رتبه را در میان علت‌های مرگ وابسته به سرطان دارد [۱]. توقف رگ‌زادایی و مهاجرت سلولی در تومور، تشدید و القای مرگ سلولی به وسیله آپوپتوز و دست‌کاری راه‌های انتقال پیام در سلول، تعدادی از استراتژی‌های جدید و امیدوارکننده در درمان و

هستند. راه انتقال پیام P13K به طور ذاتی انکوژنیک است و در بسیاری از انواع سرطان‌های انسانی دچار افزایش بیان می‌گردد. این افزایش بیان مدیون افزایش مقدار P13K یا هدف پایین دست آن AKT (سرین - ترئونین کیناز) و یا کاهش و فقدان عملکرد تنظیم‌کننده منفی آن (PTEN) می‌باشد [۱۰]. PTEN یکی از ژن‌های تومور ساپرسور انسانی است و یک نوع فسفاتاز است که فراوان‌ترین جهش‌ها را در آن در انواع سرطان می‌یابیم [۱۱]. PTEN موجب آنتاگونیزه شدن علایم پیامی P13K می‌گردد [۱۲، ۱۳، ۱۴]. با توجه به اطلاعات ارایه شده تعجب‌آور خواهد بود، اگر بدانیم که در سلول‌های دودمانی DU145 که از متاستاز تومور پروستات به مغز جدا شده و بسیار متاستاتیک و غیر حساس به آندروژن هستند وجود mRNA و پروتئین PTEN آشکار گردیده است [۱۵]. قصد ما از این مطالعه بررسی سهم احتمالی فعالیت راه P13K در قابلیت متاستاز در دو نوع دودمان سلولی DU145 (دارای PTEN فعال) و سلول دودمانی PC3 (فاقد ژن PTEN فعال) از سرطان پروستات است. به همین جهت در این مقاله ما به بررسی ایزوفورم‌های P13K پرداخته‌ایم و انواع ایزوفورم‌های موجود در هر دو نوع سلول را تعیین و مقایسه نموده‌ایم.

#### مواد و روش‌ها

محیط کشت RPMI1640 از شرکت Gibco خریداری شد. سرم جنینی گوساله از شرکت Gibco تهیه شده و در فریزر نگهداری می‌شد. تمام ظروف پلاستیکی کشت از شرکت Nunc تهیه شده بودند. رنگ‌های متیل گرین (sigma) و تریپان‌بلو (sigma) جهت شمارش کل سلول و سلول‌های زنده تهیه شده و مورد استفاده قرار گرفتند. لام Neubauer PO GmbH جهت شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های DU145، PC3 از بانک سلولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه شدند. (منبع اصلی این سلول‌ها ATCC بوده است).

**پاساژ سلولی:** جهت پاساژ سلولی از محیط کشت کامل RPMI و FCS ۱۰٪ استفاده می‌شد. به این ترتیب که بسته به نوع آزمایش و ظروف کشت مورد نظر ۱۰<sup>۴</sup> سلول زنده PC3 و یا DU-145 در هر ۲۵cm<sup>۲</sup> از ظروف کشت وارد می‌گردید. بافر PBS و محلول تریسین - EDTA برای جدا کردن سلول‌ها از کف ظروف کشت مورد استفاده قرار می‌گرفت سپس شمارش سلولی و تعیین بقای سلولی انجام شده و سلول‌ها با دانسیته مناسب کشت داده می‌شدند. در تمامی موارد و آزمایشات حداکثر تعداد پاساژهای انجام شده بیش از ۱۱ پاساژ نبود و مجدداً از سلول‌های فریز شده استفاده می‌گردید.

خارج سلولی یک روش درمانی با ارزش و نوین برای درمان تومورهای جامد و پیشگیری از تهاجم سلول‌های توموری است. اهداف ویژه چنین پروژه‌هایی شامل مهارکننده‌های گیرنده‌های کینازی فاکتورهای رشد و MMPها هستند [۷]. در راه‌های انتقال پیام برای تولید و فعال‌سازی MMPها نقش و جایگاه P13K بسیار مهم می‌باشد. به طوری که داده‌ها حاکی از تعدیل فعالیت ژلاتینازها به واسطه مسیر P13K هستند [۸]. اگر چه بیشتر مطالعات مسیر انتقال پیام P13K در مورد نوع کلاسیک P110-P13K (که اکنون به عنوان دسته I خانواده P13K شناخته شده است) انجام شده، طی ۱۰ سال گذشته معلوم شده که ابرفامیل P13K (EC2.7.1.137) از یک خانواده بزرگ از آنزیم‌هایی که از نظر ساختمانی شبیه هستند ولی سوبستراهای فسفاتیدیل اینوزیتول آنها متفاوت است، تشکیل شده‌اند. نحوه تنظیم اعضای این خانواده که احتمالاً مسوول اشتقاق عملکرد در آنها است نیز متفاوت می‌باشد. از اطلاعات حاصل از پروژه ترادف ژنوم به نظر می‌رسد که هشت نوع زیرواحد کاتالیتیک متفاوت P13K قادر به فسفریله کردن لیپیدهای اینوزیتول هستند. این هشت عضو بر اساس ساختار پروتئین، ویژگی سوبسترای لیپیدی و زیرواحدهای تنظیمی به سه دسته متفاوت قابل تقسیم هستند دسته I شامل P110 $\alpha$ , P110 $\beta$ , P110 $\delta$  و P110 $\gamma$ . دسته II شامل P13K-C2 $\alpha$ , P13K-C2 $\beta$  و P13K-C2 $\gamma$  می‌باشند و دسته III شامل Vps34p انواع محصولات لیپیدی که به وسیله این آنزیم‌ها حاصل می‌شوند P<sub>3</sub>(3,4,5), P<sub>2</sub>(3,5), P<sub>2</sub>(3,4), ptdIns3P, هستند که به شیوه‌های مختلف در انتقال پیام‌های داخل سلولی مشارکت دارند. به عنوان مثال ایزوفورم‌های  $\delta$  و  $\gamma$  P110 در مهاجرت سلولی نقش دارند، ایزوفورم‌های دسته I در اعمال حرکت سلولی، تعیین اندازه سلول و بقا و تکثیر سلولی دخالت دارند. علاوه بر این محصولات لیپیدی حاصل از فعالیت آنزیم‌های این دسته موجب ایجاد قطبیت در سلول‌های پستانداران شده و در مکانیزم‌های تهاجمی لوکوسیت‌ها دارای عملکرد هستند. ایزوفورم‌های دسته II اساساً به غشا و ساختارهای غشایی وابسته‌اند و پیام‌های انتقالی فاکتورهای رشد و سیتوکاین‌ها، فعالیت این دسته را تحریک می‌کند. ایزوفورم‌های دسته III در ترافیک داخل سلولی مواد و مولکول‌ها نقش داشته و با غشاهای داخلی در ارتباط هستند [۹]. محصولات لیپیدی آنزیم‌های ابرفامیل P13K راه‌های انتقال پیام متنوع و بی‌شماری را داخل سلول کنترل می‌نمایند. بخشی از این اشتقاق نتیجه طیف وسیع پروتئین‌های تاثیرپذیر از لیپیدهای P13K بوده و در سطحی دیگر، تنوع حاصل از وجود انواع ایزوفورم‌های P13K مسوول این تنوع در عملکرد

مورد Superscript شرکت Bio-Rad.  $40^{\circ}\text{C}$  انتخاب شد. برای هر واکنش  $0.2\mu\text{u}$  مهارکننده RNase با غلظت  $40\text{u}/\mu\text{l}$  شرکت (promega) و  $0.7\text{mM}$  dNTP (Roche) استفاده شده است.

آزمایش PCR از cDNAهای ساخته شده به ازای  $10\mu\text{l}$  از cDNAهای ساخته شده:  $20\mu\text{l}$  مخلوط آغازگرهای مستقیم و معکوس با غلظت  $10\mu\text{M}$  و  $2/5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  از شرکت Calbiochem و  $10\%$  Glycerol از Merck و  $1/2\text{u}$  آنزیم Taq از شرکت Biotoools Spain اضافه گردید. آغازگرهای F و R مربوط به ایزوفورم‌های PI3K [۱۶]، توسط سازمان انتقال خون ایران بخش کیت‌سازی ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفتند ترادف آغازگرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. ترادف آغازگرهای  $\beta\text{-Actin}$  [۱۷] عبارت است از:

F: GAGCCCCAGAGCAAGAGAGG R:  
GGCCAGCCAGGTCCAGAC

قطعات حاصل از این آغازگرها به ترتیب دارای

اندازه‌های ذیل هستند:

Actin: 368bp, P110 $\alpha$ : 432bp, P110 $\beta$ : 432bp, P110 $\gamma$ : 346bp, PI3K-C2: 381bp, Vps34p: 353bp, p85: 425bp, p55: 336bp, p50: 271bp.

استخراج RNA کل: سلول‌های PC3, DU145 کشت داده شدند. پس از اینکه سلول‌ها در حدود  $75\%$  کف ظروف را پوشانده بودند جهت استخراج RNA کل از آنها استفاده شد. استخراج RNA کل به کمک Tri Pure Isolation Reagent از شرکت Roche و طبق دستور بروشور ضمیمه انجام گرفت سپس ژل الکتروفورز RNA بر روی ژل آگاروز  $1.2\%$  و بافر  $0.5 \times$  TBE با ولتاژ  $5\text{V}/\text{cm}$  انجام شد تا سلامت نمونه‌های استخراج شده مشخص شود.

آزمایش رونویسی معکوس، ساخت cDNA: جهت انتخاب بهترین شرایط ساخت cDNA با حداقل واکنش غیر اختصاصی و بازدهی بالا از سه نوع آنزیم رونویسی معکوس MMLV-H<sup>-</sup> شرکت AMV, promega شرکت Roche و Superscript شرکت Bio-Rad واکنش رونویسی معکوس انجام شده و مدت زمان واکنش ساختن cDNA برای  $30$  و  $60$  دقیقه در نظر گرفته شد. به عنوان آغازگر واکنش از Random hexamer های ساخته شده توسط سازمان انتقال خون استفاده گردید. درجه حرارت مناسب جهت عملکرد H<sup>-</sup> MMLV با غلظت  $10\text{u}$ ،  $40^{\circ}\text{C}$  و در مورد AMV،  $48^{\circ}\text{C}$  و در

جدول ۱- ترادف مربوط به آغازگرهای F و R ایزوفورم‌های PI3k

ap110	Forward	5'-CTGTGTGGGACTTATTGAGGTGGTGC-3'
	Reverse	5'-GGCATGCTGTCTGAATAGCTAGATAAGC-3'
$\beta$ p110	Forward	5'-GAAGATTGCAAGCAGTGATAGTGC-3'
	Reverse	5'-CCTATCCTCCGATTACCAAGTCGTC-3'
$\gamma$ p110	Forward	5'-GCTTGAAAACCTGCAGAAATCTCAAC-3'
	Reverse	5'-CGTCTTTCACAATCTCGATCATTCC-3'
PI3K-C2	Forward	5'-GCAGGTTTCCTCAGTCCTACTCCAGGC-3'
	Reverse	5'-GCCAGTCAGCTGATACCATTAAACCG-3'
Vps34p	Forward	5'-CGGGATCCAAAGCCTCTTCCTCCACC-3'
	Reverse	5'-CCAGTACTGGGCAAACCTGTGAATCTG-3'
p85	Forward	5'-GCTCTCTCAAACCTCCAGCAAAAATCTG-3'
	Reverse	5'-GAAGCCRTATTTCCCATCTCGRTG-3'
p55	Forward	5'-GCTCAGCCAAGGAAACTCTTGC-3'
	Reverse	5'-CCAGTACTGGGCAAACCTGTGAATCTG-3'
p50	Forward	5'-ATGCATAACCTGCAAACACTGC-3'
	Reverse	5'-CCAGTACTGGGCAAACCTGTGAATCTG-3'

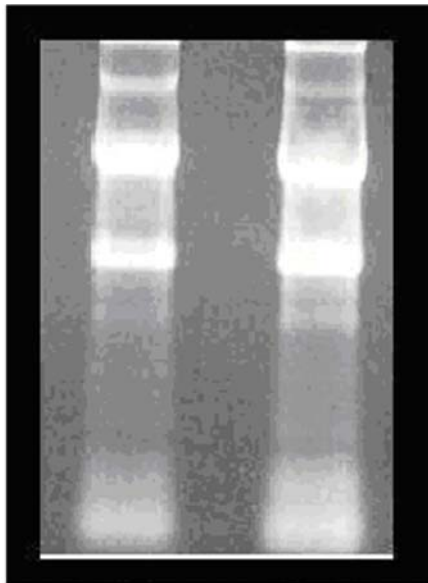
$94^{\circ}\text{C}$  1min,  $55^{\circ}\text{C}$  0.5min,  $72^{\circ}\text{C}$  1min) &  $1 \times (72^{\circ}\text{C}$  5min). دستگاه ترمال - سایکلر مورد استفاده دستگاه Techne بود.

شرایط سیکل‌های PCR برای  $\beta\text{-actin}$ :  $30 \times (94^{\circ}\text{C}$  1min,  $55^{\circ}\text{C}$  1min,  $72^{\circ}\text{C}$  1min) &  $1 \times (72^{\circ}\text{C}$  5min) و مشخصات سیکل‌های تکثیر برای PI3K:  $30 \times$

## نتایج

آزمایشگاه استخراج RNA کل از هر دو نوع سلول انجام شد. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود ژل الکتروفورز RNA های استخراج شده از هر دو نوع سلول سلامت و کیفیت مناسب RNA ها را نشان می‌دهد.

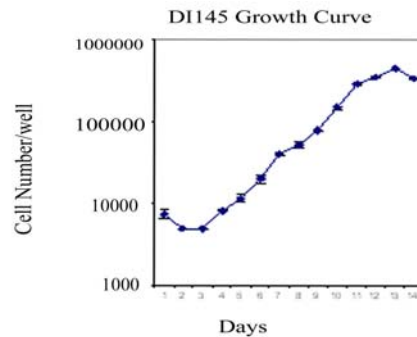
برای محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی P.D.T (population doubling time) به عنوان یک شناسه از سلول منحنی رشد سلول رسم شد (نمودارهای شماره‌های ۱ و ۲).



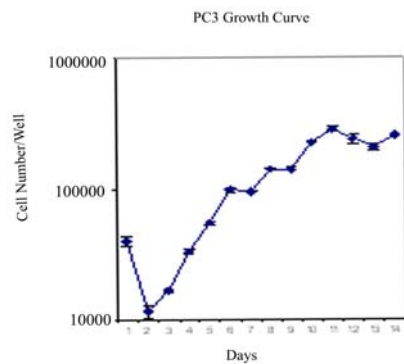
PC3 DU145

شکل ۱- RNA کل سلول

در این آزمایشات برای انتخاب بهترین شرایط از سه آنزیم AMV و MMLV و Superscript برای رونویسی معکوس استفاده شد. ژل الکتروفورز محصولات RT-PCR حاصل از RNA استخراج شده از سلول‌های DU145 و PC3 به وسیله آغازگرهای PI3K در شکل‌های ۲ تا ۶ نشان داده شده است.

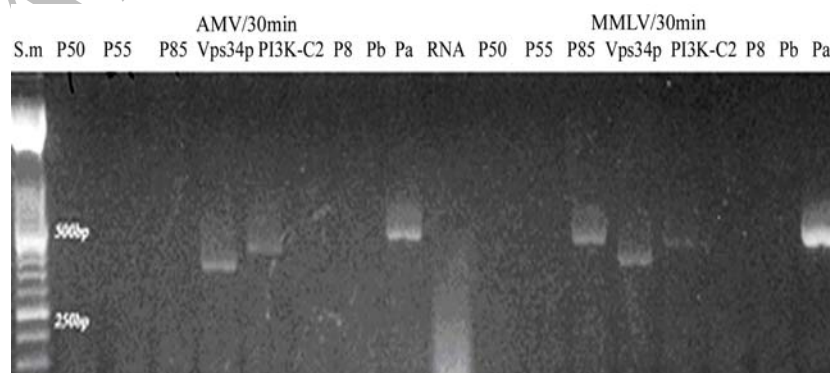


نمودار ۱- منحنی رشد سلول‌های DU145

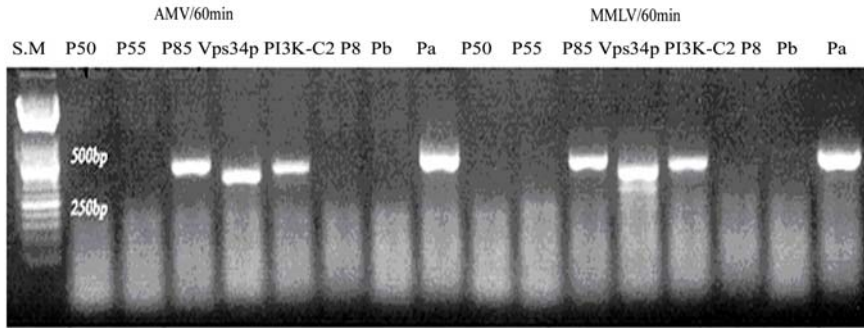


نمودار ۲- منحنی رشد سلول‌های PC3

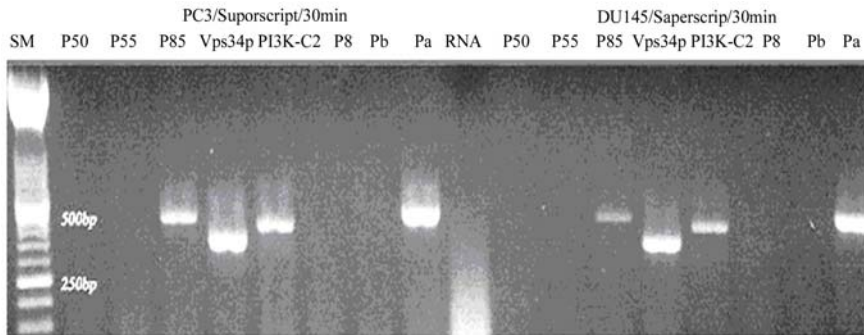
محاسبات میانگین آزمایشات انجام شده برای سلول‌های PC3، معادل ۲۷ ساعت و برای DU145، P.D.T معادل ۲۸ ساعت را نشان می‌دهند. پس از سازگار شدن سلول‌ها با شرایط



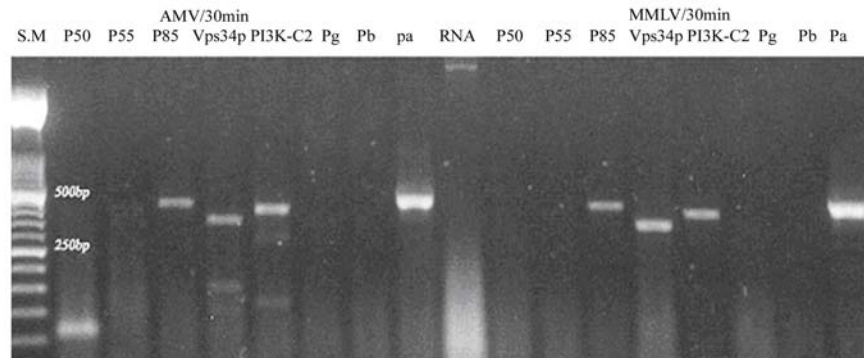
شکل ۲- ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های DU145. مدت زمان عمل آنزیم ۳۰ دقیقه



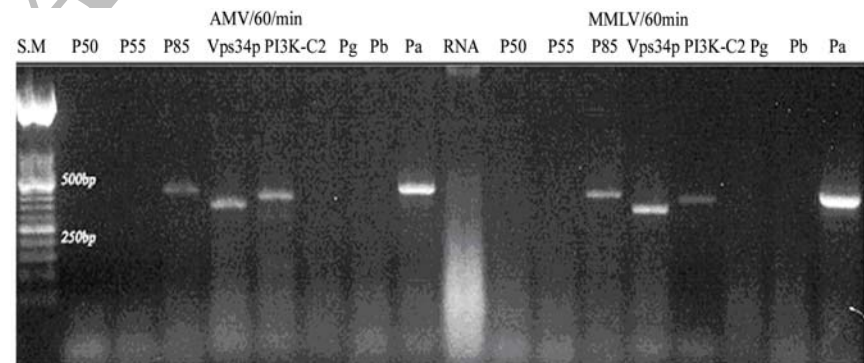
شکل ۳- ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های DU145. مدت زمان عمل آنزیم ۶۰ دقیقه



شکل ۴- ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های DU145 و PC3 که به وسیله آنزیم superscript رونویسی معکوس از RNA آنها انجام شده است



شکل ۵- ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های PC3. مدت زمان عمل آنزیم ۳۰ دقیقه

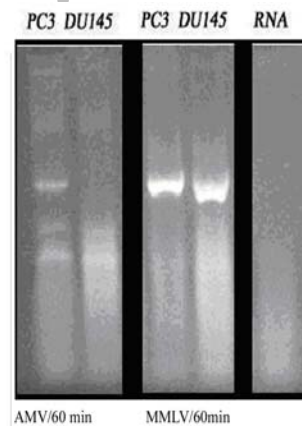


شکل ۶- ایزوفورم‌های PI3K در سلول‌های PC3. مدت زمان عمل آنزیم ۶۰ دقیقه

## بحث

در این مطالعه دو نوع سلول دودمانی سرطان پروستات که بسیار تهاجمی بوده و از متاستاز سلول‌های سرطانی به مغز و مغز استخوان بیمار جدا شده‌اند، سلول‌های PC3 و DU145، جهت تعیین چگونگی بیان ایزوفورم‌های PI3K مورد آزمون قرار گرفتند. برای این مطالعه از سه نوع آنزیم رونویسی معکوس گرفتند. AMV، MMLV-H<sup>-</sup> و Superscript استفاده شد و شرایط زمانی مختلف انکوباسیون RNA الگو و آنزیم مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی‌ها از جهت بهینه‌سازی شرایط آزمایش و اخذ نتیجه بهتر از آزمایش‌های PCR لازم به نظر می‌رسید. در این آزمایشات بیان هشت ایزوفورم  $\gamma$  و  $\beta$  و  $\alpha$  P110، P50، 55، 85، P13K-C<sub>2</sub> و Vps34p بررسی شد. آزمایشات نشان دادند که در هر دو نوع سلول PC3 و DU145 ایزوفورم‌های  $\alpha$  P110، P85، P13K-C<sub>2</sub> و Vps34p بیان می‌شوند. بنابراین الگوی بیان ایزوفورم‌های مورد بررسی در سلول‌های PC3 و DU145 یکسان بوده و تفاوتی در بیان انواع مورد مطالعه مشاهده نگردید و نیز برای هر سه آنزیم مورد استفاده این الگو یکسان بوده و در تمام انکوباسیون‌ها همان ایزوفورم‌ها مشاهده شدند. با این که مطالعات با مهارکننده‌های PI3K در *in vitro* نشان داده‌اند که عملکرد ایزوفورم‌های این آنزیم برای تحرک سلولی و متاستاز لازم است [۱۸] تا کنون هیچ‌گونه بررسی از نوع ایزوفورم‌های موجود در سلول‌های سرطان پروستات و نقش آنها در قدرت تهاجمی این سلول‌ها انجام نشده است. ولیکن محققان نشان داده‌اند که مسیر PI3K در سلول‌های کارسینومای پروستات انسانی مهمترین مسیر انتقال پیام برای اغلب فاکتورهای رشد می‌باشد [۱۹]. فعال شدن مزمن مسیر PI3K منجر به رشد متاستاتیک سلول‌ها می‌گردد ولی تا کنون مکانیسم آن روشن نشده است [۲۰]. با این وجود این مسیر برای توسعه روش‌های درمانی یک زمینه بسیار مورد توجه بوده است [۲۱]. محققان قویا پیشنهاد می‌کنند، ایزوفورم‌های دسته II موجب اختلال در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول گردیده و عامل حیاتی برای بقای سلول سرطانی هستند [۲۲]. به تازه‌گی یک پروتئین کیناز جدید (NOK: Novel Oncogene with Kinase-domain) شناسایی شده است که تنها در پروستات به فراوانی یافت می‌شود. NOK از طریق فعال کردن مسیر PI3K، موجب تومورزایی و متاستاز سلول‌های پروستاتی می‌گردد [۲۳]. تحقیق حاضر اولین گزارش از بررسی الگوی بیان ایزوفورم‌های خانواده PI3K در سلول‌های PC3 و DU145 است و تا کنون گزارش دیگری در این مورد ارایه نگردیده است. با توجه به اینکه سلول‌های DU145 واجد ژن تومور ساپرسور PTEN هستند که

همان طور که مشاهده می‌شود برای هر دو آنزیم AMV و MMLV نتیجه انکوباسیون به مدت زمان ۶۰ دقیقه از انکوباسیون به مدت زمان ۳۰ دقیقه بسیار بهتر می‌باشد. ژل الکتروفورز محصولات PCR-RT از RNA استخراج شده از سلول‌های DU145 و PC3 و به وسیله آغازگرهای PI3K و آنزیم Superscript (شکل شماره ۴) نشان می‌دهد عملکرد این آنزیم برای واکنش رونویسی معکوس مناسب است. برای سلول‌های PC3 استفاده از محصول واکنش رونویسی معکوس به وسیله آنزیم AMV در مدت زمان ۳۰ دقیقه برای آزمایش PCR تعدادی بندهای اضافه و غیراختصاصی را نیز نشان داده است این نتیجه در شکل‌های ۵ و ۶ مشاهده می‌شود. آزمایش RT-PCR از RNAهای استخراج شده از سلول‌ها به وسیله آنزیم‌های رونویسی معکوس AMV و MMLV و آغازگرهای اکتین در شکل شماره ۷ نشان داده شده است.



شکل ۷- RT-PCR بتا اکتین از سلول‌های PC3 و DU145

نتیجه کار با آنزیم MMLV قابل قبول بوده و باندهای مربوط به اکتین به صورت تک‌باند مشاهده میشوند. با توجه به نتایج حاصله از آنزیم MMLV و مدت زمان انکوباسیون ۶۰ دقیقه برای انجام تمام آزمایشات بعدی و RT-PCR تمام ایزوفورم‌ها و اکتین استفاده شد. با تکرار حداقل سه بار آزمایش، نتایج نشان دادند که ایزوفورم کاتالیتیک  $\alpha$  P110 و ایزوفورم تنظیمی P85 از دسته I خانواده PI3K و ایزوفورم PI3K-C<sub>2</sub> از دسته II و ایزوفورم Vps34p از دسته III خانواده PI3K در هر دو نوع سلول بیان می‌شوند و هیچ‌گونه اختلافی از نظر نوع ایزوفورم‌های مورد بررسی در این سلول‌ها مشاهده نگردید. در این آزمایشات بیان ژن‌های P50، 55 و  $\beta$  و  $\gamma$  P110 برای هر دو نوع سلول مشاهده نشد.

سلول‌های اپی‌تلیالی غدد پستانی انسان نیز نشان داده شده است [۲۶، ۲۷].

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیقات سایر محققین که شرح آن داده شد و مطالعات انجام شده در این تحقیق در صورتی که تحقیقات آتی ما برای کمیت سنجی انواع ایزوفورم‌ها نشان‌دهنده مقدار بیان تغییر یافته برخی ایزوفورم‌ها در سلول‌های PC3 و DU145 باشد می‌توان به وسیله مهار کردن ژن کاندید توان تهاجمی سلول‌ها را کنترل نمود و بدین ترتیب دریچه جدیدی از امید برای کنترل پدیده متاستاز این بدترین وجه سرطان، گشوده خواهد شد.

#### تشکر و قدر دانی

این تحقیق بخشی از طرح مصوب شماره ۲۱۸ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بوده و بودجه آن توسط این پژوهشگاه تامین گردیده است. همکاری صمیمانه سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات و به خصوص آقای دکتر احمد قره باغیان معاون محترم آموزشی و پژوهشی سازمان انتقال خون ایران در اجرای این تحقیق قابل تقدیر است.

عمل PI3K را آنتاگونیست می‌کند. انتظار می‌رفت که این سلول‌ها از نظر توان تهاجمی کنترل شده و از نظر قدرت متاستاز نسبت به سلول‌های PC3 ضعیف‌تر باشند به همین علت الگوی بیان ایزوفورم‌های PI3K در این سلول‌ها و در مقایسه با سلول‌های PC3 (که فاقد تومور ساپرسور PTEN بوده و عملکرد PI3K از کنترل آنتاگونیستی این ژن خارج شده است) بررسی گردید ولی هیچ گونه اختلافی مشاهده نشد. در مرحله بعد به وسیله روش‌های کمی مقدار بیان ایزوفورم‌های PI3K در این دو نوع سلول تعیین خواهد شد. بدیهی است مشاهده هر گونه اختلاف در مقدار بیان ژن‌های ایزوفورم‌های تعیین شده می‌تواند نشان‌دهنده نوعی ارتباط بین ایزوفورم مربوطه و توان متاستاتیکی سلول باشد چنانکه بررسی‌های جدید محققین نشان داده است که در سلول‌های DU145، PI3K در قدرت تهاجمی سلول نقش عمده‌ای دارد [۲۴]. در این رابطه گزارشات نشان می‌دهند هیالورونن از ماتریکس خارج سلولی و گیرنده‌های سلول‌های سرطانی پروستات در راه‌های انتقال پیام با ایزوفورم P110 $\alpha$  به گونه‌ای در ارتباطند که منجر به متاستاز می‌گردند [۲۵]. این در حالی است که ویژگی‌های سرطان‌زایی ایزوفورم‌های جهش یافته  $\beta$  و P110 $\alpha$  در

#### References:

- [1] Davies MA. Kim SJ. Parikh NU. Dong Z. Bucana CD. Gallick GE. Adenoviral-mediated expression of MMAC/PTEN inhibits proliferation and metastasis of human prostate cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1904-1914.
- [2] Ross S. Spencer SD. Holcomb I. Tan C. Hongo J. Devaux B. et al. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res* 2002; 62:2546-2553.
- [3] Jalkut MW. Reiter RE. Role of prostate stem cell antigen in prostate cancer research. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 401-406.
- [4] Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* 1999; 76:1-20.
- [5] Uria JA. Lopez-Otin C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res* 2000; 60: 4745-4751.
- [6] Stetler-Stevenson WG. Liotta LA. Kleiner DE Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 1993; 7:1434-1441.
- [7] Cherrington JM. Strawn LM. Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000; 79: 1-38.
- [8] Kubiakowski T. Jang T. Lachyankar MB. Salmons R. Nabi RR. Quesenberry PJ. et al. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *J Neurosurg* 2001; 95: 480-488.
- [9] Vanhaesebroeck B. Ali K. Bilancio A. Geering B. Foukas LC. Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 194-204.
- [10] Jiang BH. Zheng JZ. Lu Z. Hunter T. Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 363-369.
- [11] Yamada KM. Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 2001; 114: 2375-2382.
- [12] Roux P. PTEN: a tumor suppressor with original properties. *Bull Cancer* 1999; 86: 522-525.

- [13] Hang YE. Wu X. Suzuki H. Reiter RE. Tran C. Vessella RL. et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 5246-5250.
- [14] McMenamin ME. Soung P. Perera S. Kaplan I. Loda M. Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999; 59: 4291-4296.
- [15] Yang Y. Niu J. Guo L. The effects of antisense insulin-like growth factor-I receptor oligonucleotide on human cord blood lymphocytes. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 207-212.
- [16] Foster FM. Traer CJ. Abraham SM. Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 2003; 116: 3037-3040.
- [17] Fruman DA. Towards an understanding of isoform specificity in phosphoinositide 3-kinase signalling in lymphocytes. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 315-319
- [18] Wymann MP. Marone R. Phosphoinositide 3-kinase in disease: timing, location, and scaffolding. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 141-149
- [19] Lin J. Adam RM. Santiestevan E. Freeman MR. The phosphatidylinositol 3'-kinase pathway is a dominant growth factor-activated cell survival pathway in LNCaP human prostate carcinoma cells. *Cancer Research* 1999; 59: 2891-2897.
- [20] Leenders F. Mopert K. Schmiedeknecht A. Santel A. Czauderna F. Aleku M. et al. PKN3 is required for malignant prostate cell growth downstream of activated PI 3-kinase. *The EMBO Journal* 2004; 23: 3303-3313.
- [21] Hawkins PT. Anderson KE. Davidson K. Stephens LR. Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 647-662.
- [22] Kang S. Song J. Kang J. Kang H. Lee D. Lee Y. et al. Suppression of the alpha-isoform of class II phosphoinositide 3-kinase gene expression leads to apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 6-10.
- [23] Liu L. Yu XZ. Li TS. Song LX. Chen PL. Suo TL. et al. A novel protein tyrosine kinase NOK that shares homology with platelet- derived growth factor/fibroblast growth factor receptors induces tumorigenesis and metastasis in nude mice. *Cancer Res* 2004; 64, 3491-3499.
- [24] Zeng ZZ. Jia Y. Hahn NJ. Markwart SM. Rockwood KF. Livant DL. Role of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in integrin fibronectin receptor-mediated, matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by metastatic prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 8091-8099.
- [25] Lin SL. Chang D. Ying SY. Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28:310-320.
- [26] Zhao JJ. Liu Z. Wang L. Shin E. Loda MF. Roberts TM. The oncogenic properties of mutant p110alpha and p110beta phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 18443-18448.
- [27] Zhao JJ. Cheng H. Jia S. Wang L. Gjoerup OV. Mikami A. et al. The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16296-16300.