

میکروویکول های گلیوبلاستوما (غده گلیایی)، RNA و پروتئین هایی را انتقال می دهند که رشد تومور را توسعه داده و بیومارکرهای تشخیصی را فراهم می نمایند

حمید چشمی

کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

سابقه و هدف: سلول های تومور گلیوبلاستوما میکروویکول های (اکسوزوم های) محتوی miRNA، mRNA و پروتئین های آنژیوژنیک را آزاد می کنند. این میکروویکول ها بوسیله سلول های نرمال میزبان همچون سلول های اندوتلیال ریزرگی مغز (brain microvascular endothelial cells) جذب می شوند.

مواد و روش ها: از طریق ترکیب یک mRNA با یک پروتئین گزارش گر و انتقال آن ها به درون این میکروویکول ها، تشخیص دادیم که پیام های تحویل شده توسط میکروویکول ها بوسیله سلول های گیرنده ترجمه شده اند. این میکروویکول ها همچنین غنی از پروتئین های رگ زایی می باشند و تشکیل توبول را از طریق سلول های اندوتلیال تحریک می کنند.

یافته ها: میکروویکول های مشتق شده از تومور به عنوان وسیله تحویل دهنده اطلاعات ژنتیکی و پروتئین ها به سلول های گیرنده در محیط توموری به کار می روند. میکروویکول های گلیوبلاستوما همچنین تکثیر دودمان سلولی گلیومای انسان را تحریک می نمایند، که نمایان کننده جنبه خودترقی دهنده آن ها است. RNA پیامبر جهش یافته / متغیر و miRNA اختصاصی گلیوماها را می توان در میکروویکول های سرم بیماران مبتلا به گلیوبلاستوما تشخیص داد.

نتیجه گیری: EGFRvIII مختص تومور (tumor-specific) در میکروویکول های ۷ نفر از ۲۵ بیمار مبتلا به گلیوبلاستوما تشخیص داده شد. بنابراین میکروویکول های مشتق شده از تومور ممکن است اطلاعات تشخیصی را فراهم کرده و به واسطه آزمایش خون به تصمیمات درمانی در مورد بیماران سرطانی کمک نمایند.

کلمات کلیدی: گلیوبلاستوما، EGFRvIII، miRNA، میکروویکول

مقدمه

گلیوبلاستوماها تومورهای بسیار بدخیم مغز می باشند که علی رغم تحقیقات متمرکز و تلاش های کلینیکی، احتمال بهبودی این بیماری به واسطه پیش بینی آن ضعیف می باشد (Stupp et al., 2005). این بیماری و بسیاری دیگر از تومورها، دارای توانایی قابل ملاحظه ای برای تغییر محیط

استرومایی به گونه ای که به نفع خودشان باشد، می باشند. سلول های تومور محیط نرمال سلول ها را به محیطی مناسب برای رشد سلول توموری، مهاجم، مقاومت شیمیایی، گریز از سیستم ایمنی (Immune evasion) و متاستاز تبدیل می نمایند (Mazzocca et al., 2005; Muerkoster et al., 2004) سلول های توموری همچنین از سیستم رگی نرمال استفاده نموده و تشکیل سریع رگ های خونی جدید را به منظور فراهم کردن مواد غذایی تومور تحریک می کنند (Carmeliet et al., 2000). اگرچه سیستم ایمنی در ابتدا قادر به مهار رشد تومور می باشد اما این عمل اغلب

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشکده ی علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

Email: hamid.ch65@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۳/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۳۱

به عنوان واکسن های آنتی توموری به کار روند (Chaput et al., 2005). میکروویزیکول های مشتق از دندریتیک سل ها محتوی پروتئین های کمک تحریکی (co-stimulatory) ضروری برای فعال سازی سلول های T می باشند، در حالی که اکثر میکروویزیکول های مشتق شده از سلول های توموری این گونه نیستند. در عوض، آن ها در جهت ممانعت از پاسخ ایمنی عمل کرده و سبب تسریع در رشد و متاستاز تومور می گردند (Wieckowski et al., 2006; Clayton et al., 2007; Ginestra et al., 2006; Liu et al., 1998). میکروویزیکول های سرطان پستان، رگ زایی را تحریک می کنند و میکروویزیکول های مشتق شده از پلاکت ها توسعه و متاستاز سلول های سرطان شش را توسعه می دهند (Janowska-Wieczorek et al., 2005; Millimaggi et al., 2007). بافت های گلیوبلاستومای انسان از برش های حاصل از جراحی حاصل گردیدند. سلول های توموری، تفکیک شده و به صورت تک لایه در محیط کشت حاوی سرم جنینی گاو (FBS) تهی شده از میکروویزیکول ها (dFBS) کشت داده شدند.

سلول های اولیه کشت شده حاصل از سه تومور گلیوبلاستوما، تولید میکروویزیکول ها را در پاساژهای اولیه و بعدی (پاساژهای ۱-۱۵) نشان دادند. سلول های توموری با میکروویزیکول های متفاوت در اندازه های حدوداً ۵۰-۵۰۰ nm پوشیده شده بودند (شکل ۱a, b).

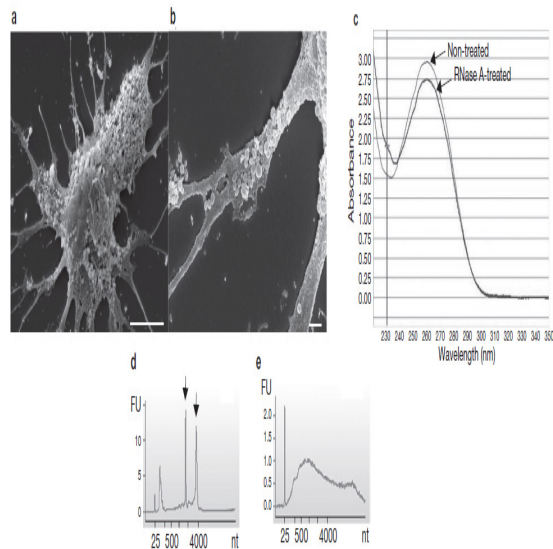
میکروویزیکول ها حاوی RNA و پروتئین به نسبت تخمینی ۱:۸۰ بودند. برای ارزیابی این مطلب که آیا میکروویزیکول ها محتوی RNA می باشند یا نه، آن ها را یا در معرض RNase قرار داده و یا بدون تیمار با RNase A عمل استخراج RNA از آن ها انجام گرفت (شکل ۱c). در این حالت پس از عمل RNase به طور مداوم به میزان کمتر از ۷٪ محتوی RNA تحت تاثیر قرار گرفته، کاهش می یابد. بنابراین به نظر می رسد که تقریباً تمام محتوی RNA درون وزیکول ها قرار گرفته و بوسیله غشای احاطه کننده از اثر RNase خارجی محافظت می شود. آنالیزهای زیستی (Bioanalysis) در رابطه

به طور پیشرونده ای از طریق فعال سازی مسیرهای مهار سیستم ایمنی توسط تو مور کند می گردد (Gabrilo, 2007). مطالعات اخیر اهمیت ارتباطات بین سلول های توموری و محیط شان را در طول تحلیل غشای میکروویزیکول ها نشان می دهد، که در این حالت سلول های نزدیک بهم توانایی اتصال به یکدیگر را خواهند داشت (Ratajczak et al., 2006). میکروویزیکول ها دارای قطر ۳۰-۱۰۰ nm می باشند که از انواع مختلف سلول های متفاوت در هر دو حالت نرمال و پاتولوژیکی جدا می شوند (Thery et al., 2002). این اکسوزوم ها می توانند از جوانه زنی درونی غشاهای اندوزومی تشکیل شده باشند که در این حالت اجسام چند وزیکولی درون سلولی (MVB) شکل می گیرند که بعداً به غشای پلاسمایی ملحق شده و اکسوزوم ها به خارج رها می شوند (Thery et al., 2002; Pan et al., 1983).

آن ها همچنین می توانند همچون حالت نشان داده شده برای jurkat T-cells مستقیماً از طریق جوانه زنی غشای پلاسمایی رها گردند (Booth et al., 2006). میکروویزیکول ها در دروزوفیلان *Drosophila melanogaster*، که ارگوزوم (argosome) نامیده می شوند، مورفوزن هایی همچون پروتئین *wingless* را دربردارند، که در سرتاسر صفحه اپی تلیم متصور در تکوین جنین حرکت می کنند (Greco et al., 2001). میکروویزیکول های یافت شده در منی، باعنوان پروستازوم (prostasomes) شناخته می شوند که قادرند تحرک اسپرم را توسعه داده، واکنش های اکروزوم را تثبیت کرده و به ممانعت ایمنی و مهار رگ زایی کمک نمایند (Delves et al., 2003). از طرف دیگر، پروستازوم های آزاد شده بوسیله سلول های پروستات سرطانی، رگ زایی را افزایش می دهند. نشان داده شده که میکروویزیکول ها قادرند تا محتویاتشان را به انواع دیگری از سلول ها منتقل نمایند (Mack et al., 2000; Al-Nedawi et al., 2008; Valadi et al., 2007; Baj-Krzyworzeka et al., 2006). میکروویزیکول های مشتق شده از سلول های B (B cells) و دندریتیک سل ها (dendritic cells) در محیط *in vivo* دارای توانایی تحریک سیستم ایمنی بوده و اثرات آنتی توموری دارند که قادرند تا

میکروویکول های مربوط به هر دو آرایه نمایان شدند که تعیین کننده فرایند غنی سازی انتخابی درون میکروویکول ها است (اطلاعات تکمیلی، جدول S۱). در سازگاری با این مطلب، نوعی همبستگی همه جانبه ضعیف در سطوح مولکول های mRNA درون سلول در مقایسه با میکروویکول های حاصل از دو تومور متفاوت وجود دارد (شکل ۲a, b) که حمایت کننده غنی سازی انتخابی برخی مولکول های mRNA سلولی در میکروویکول ها است. در مقابل، مقایسه سطوح مولکول های mRNA خاص در تمهیدات متفاوت سلول های دهنده یا میکروویکول ها، همبستگی قوی را نمایان کرده که تعیین کننده توزیع همسان درون این اجزای سلولی متمایز می باشد (شکل ۲c, d). ما ۳۴۲۶ رونوشت که به طور متفاوتی به میزان ۵ برابر توزیع شده بودند ($p < 0.01$) را یافتیم. ۲۲۳۸ رونوشت از آن ها غنی شده بودند (تا حد ۳۸۹ برابر) و ۱۱۸۸ رونوشت دارای فراوانی کمتر از این مقدار در سلول ها بودند (تا حد ۹۰ برابر، شکل ۲e). مقادیر و نسبت های همه رونوشت های ژنی در اطلاعات تکمیلی موجود در جدول S۲ نشان داده شده اند. اطلاعات تکمیلی موجودیت رونوشت های mRNA غنی شده یا کاسته شده در حد بیش از ۱۰ برابر، در اطلاعات تکمیلی، جدول S۳، فهرست گردیده است.

رونوشت هایی از mRNA که در مقایسه با سلول ها در میکروویکول ها بسیار فراوانند، همیشه در میکروویکول ها فراوان تر نیستند. فراوانی بیشتر رونوشت ها احتمالاً با تولید یک اثر در سلول های گیرنده به محض دریافت، باور کردنی تر خواهد بود. ۵۰۰ رونوشت فراوانتر mRNA در میکروویکول ها از طریق فرآیندهای مختلف زیست شناسی بر پایه توصیفات هستی شناسی درون میکروویکول ها تقسیم گردیدند (شکل ۲f). مولکول های mRNA میکروویکول گلیوبلاستوما متعلق به هستی شناسی هایی همچون رگ زایی، تکثیر سلولی، پاسخ ایمنی، مهاجرت سلولی و مدیفیکاسیون هیستون در مقایسه با سطوح دیگر رسم شده و به طیف mRNA کمک نمودند (شکل ۲g). این هستی شناسی ها به این دلیل انتخاب شدند که آن ها وظایفی را نمایان می سازند که قادرند در تغییر حالات استرومای تومور (tumor stroma) و افزایش رشد



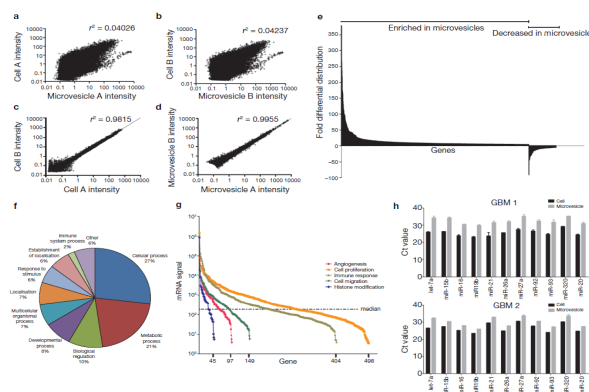
شکل ۱- سلول های گلیوبلاستوما میکروویکول های محتوی RNA را تولید می کنند. (a) تصویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از یک سلول گلیوبلاستوما اولیه. (b) نمایش میکروویکول های روی سطح سلول با بزرگنمایی بیشتر. ویکول ها قادرند مجتمع شده و به قطری در حدود ۵۰ تا ۵۰۰ nm در آیند. (c) میکروویکول ها در معرض RNase A قرار گرفتند و در حالت دیگر این اثر اعمال نشد، سپس RNA استخراج شده و سطوح RNA تعیین گردید ($n=5$). داده های حاصل از آنالیز زیستی، اندازه های مختلفی را برای مولکول های RNA استخراج شده از سلول های گلیوبلاستوما اولیه (d) و میکروویکول های استخراج شده از آنها (e) نشان داده است. کوچکترین قله نمایانگر استاندارد درونی است. دو قله بزرگتر در شکل d (فلش ها) حضور RNA ریبوزومی ۱۸S (چپ) و ۲۸S (راست) را نشان می دهند که در میکروویکول ها وجود ندارند (FU: واحدهای فلورسنت، nt: نوکلئوتیدها). مقیاس از ۱۰ μm (a) و ۱ μm (b) می باشند.

با مولکول های RNA درون میکروویکول ها و سلول های دهنده آن ها مبین این مطلب است که میکروویکول ها محتوی دامنه وسیعی از مولکول های RNA در اندازه های مختلف بوده که شامل انواعی از mRNA و miRNA ها می شوند، اما فاقد RNA های ریبوزومی (rRNA) که مشخصه RNA سلولی می باشند هستند (شکل ۱d, e).

آنالیز ریزآرایه ای جمعیت های mRNA در میکروویکول ها و سلول های گلیوبلاستوما دهنده آن ها، با استفاده از Agilent ۴۴K در سراسر ریزآرایه ژنوم بکار برده شد. به طور تخمینی در مورد هر دو آرایه ۲۲۰۰۰ رونوشت ژن در سلول ها و ۲۷۰۰۰ در میکروویکول ها نمایان گردید (مشخص شده در سطوح پس زمینه ای خوب با ۹۹٪ اطمینان). تقریباً ۴۷۰۰ mRNA متفاوت منحصر در

تومور همبسته نشده بودند. میکروویکول های گلیوبلاستوما نشاندار شده که با رنگ فلورسنت PKH67 نشاندار شده بودند در محیط کشت با سلول های اندوتلیال ریزرگی مغز انسان (HBMVEC) انکوبه گردیدند. میکروویکول های نشاندار با PKH67 از طریق سلول های اندوتلیال مغز به درون ساختارهای شبه اندوزومی وارد گردیدند (شکل ۳a). زمانی که میکروویکول هایی که به صورت فلورسنت نشاندار شده بودند به سلول های گلیوبلاستوما اولیه اضافه گردیدند نیز نتایج مشابهی حاصل گردید (داده ها نشان داده نشده اند). برای تشخیص اینکه آیا mRNA تحویل شده توسط میکروویکول های مشتق شده از گلیوبلاستوما می تواند در سلول های پذیرنده بیان شود، سلول های گلیوبلاستوما در ابتدا همراه با یک وکتور لنتی ویروسی کد کننده *Gaussia luciferase* (Gluc) متاثر گردیدند (Tannous et al., 2005) و میکروویکول های تولید شده توسط آن ها از محیط کشت شرطی شده (conditioned medium) تخلیص گردیدند. آنالیز RT-PCR نشان داده است که mRNA تولید شده برای Gluc (محصول ۵۵۵-bp) به خوبی GAPDH (محصول ۲۲۶-bp) در میکروویکول ها نمایان بوده است (شکل ۳b). میکروویکول های تخلیص شده محتوی mRNA می Gluc به سلول های HBMVEC افزوده گشته و فعالیت Gluc آزاد شده به درون محیط کشت بوسیله این سلول های اندوتلیال در طول روند آزمایش مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳c). Gluc تولید شده بوسیله سلول های پذیرنده یک افزایش فعالیت مداوم را در سراسر ۲۴ h نشان داد که ترجمه مداوم mRNA می Gluc را تایید می کند. این روش نشان می دهد که mRNA تثبیت شده درون میکروویکول های تومور می تواند به سلول های نرمال پذیرنده تحویل شده و یک پروتئین کارا حاصل گردد.

به این دلیل که اسیدهای نوکلئیک در عمل تشخیصی PCR حساسیت زیادی دارند به عنوان مارکرهای زیستی دارای ارزش بالایی می باشند. ما این مطلب که آیا RNA موجود در میکروویکول ها می تواند به عنوان یک بیومارکر برای تومورهای گلیوبلاستوما ایفای نقش نماید، را مورد بررسی قرار می دهیم.



شکل ۲- توصیف صفات اختصاصی mRNA میکروویکول. (a,b) نمودارهای پراکندگی (scatterplots) سطوح mRNA در میکروویکول ها در مقایسه با سلول های دهنده حاصل از دو آزمایش متفاوت. رگرسیون های خطی نشان می دهد که سطوح در سلول ها برخلاف میکروویکول ها همبستگی ندارند. (c,d) در مقابل، فراوانی mRNA در دو سلول متفاوت یا دو میکروویکول متفاوت بدست آمده همبستگی بسیار ضعیفی دارند. (e) ۳۴۲۶ ژن یافت شدند که در میکروویکول ها به میزان ۵ برابر بیشتر از سلول هایی که میکروویکول ها از آن ها انشقاق یافته اند توزیع شده بودند ($P < 0.01$). (f) پردازش زیستی هستی شناسی ۵۰۰ گونه فراوانتر mRNA در میکروویکول ها. (g) کثرت مولکول های RNA میکروویکول متعلق به هستی شناسی های مرتبط با رشد تومور نشان داده شده است. محور X تعداد رونوشت های موجود در هستی شناسی را نمایان می کند. کثرت سطوح میانی آرایه ها ۱۸۲ می باشد. (h) سطوح مولکول های miRNA بالغ موجود در میکروویکول و سلول های گلیوبلاستوما حاصل از دو بیمار متفاوت (GBM1, GBM2) با استفاده از RT PCR کمی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سیکل آستانه (ct) به صورت $\text{mean} \pm \text{s.e.m}$ نمایان گردیده است ($n=4$).

تومور درگیر باشند. همه پنج هستی شناسی در مقایسه با سطح فراوانی سیگنال میانی آرایه، دارای مولکول های mRNA می با سطوح بیان بیش از حد بودند. مقادیر miRNA بالغ موجود در میکروویکول ها و سلول های دهنده از طریق PCR رونوشت معکوس کمی (quantitative miRNA reverse transcription) نمایان گردیدند. زیر مجموعه ای از miRNA 11 شناخته شده که در گلیوماها فراوان اند (اطلاعات منتشر نشده، A.M.K) به سهولت در سلول های دهنده و میکروویکول های حاصل از دو گلیوبلاستوما اولیه متفاوت، نمایان گردیده بود (GBM1 و GBM2) در (شکل ۲h). به طور کلی سطوح در میکروویکول ها در هر μg از کل RNA به نسبت سلول های والدینی، پایین تر بودند (۱۰٪)، مطابق با میزان تقریبی (۳ct) اما آنچنان که باید، با خصوصیات (profile)

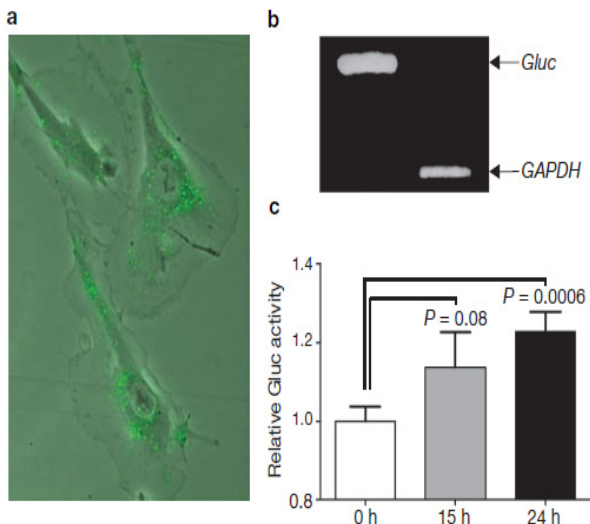
که سرم شان در طول مدت جراحی نگه داشته شده بود از میکروویکول ها تکثیر یابد (جدول ۱، اطلاعات تکمیلی، شکل S۱). به طور جالب توجهی، دو بیمار با نمونه های توموری EGFRvIII منفی، برای میکروویکول های سرم مثبت بودند، حالتی که حمایت کننده بیان هتروژنوس EGFRvIII در تومور گلیوما است. پیام EGFRvIII در پنج نمونه سرمی که دو هفته پس از برداشت کامل تومور جمع آوری شده بودند، قابل تشخیص نبود، که چهار مورد از این نمونه ها مربوط به تومورهای EGFRvIII مثبت بودند، که با منبع میکروویکول بودن تومور سازگار می باشد. علاوه بر این، EGFRvIII در میکروویکول های سرم حاصل از ۳۰ فرد نرمال کنترل نمایان نگردید (اطلاعات تکمیلی، شکل S۲). ما همچنین دریافتیم که ۲۱-miRNA، در تومورهای گلیوبلاستوما بیان بیش از حدی داشته (Chan et al., 2005) و به میزان بسیار بالایی در

mRNA گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) با تجلی به صورت EGFRvIII (جهش یافته/متغیر) که مخصوص برخی تومورها و تعاریف کلینیکی زیرگروه های گلیوما می باشد، به طور ویژه ای جالب توجه است (Pelloski et al., 2007). برای تشخیص اینکه چه نوع mRNA EGFRvIII در بافت گلیومای جدا شده وجود دارد از یک RT-PCR داخلی (nested RT-PCR) استفاده گردید و نتایج با میکروویکول های تخلیص شده از نمونه سرمی منجمد همان بیمار مقایسه گردید. نمونه ها کد شده بودند و PCR بدون اطلاع از نوع نمونه انجام گردید. چهارده وونوشت از ۳۰ نمونه توموری (۴۷٪) محتوی رونوشت - EGF vIII بودند، که با درصد گلیوبلاستوماهای حاوی این جهش در دیگر مطالعات سازگار است (Nishikawa et al., 2004). EGFRvIII می تواند در هفت نفر از ۲۵ بیمار (۲۸٪)

جدول ۱ - RNA موجود در میکروویکول های گلیوبلاستوما می تواند به عنوان یک مارکر زیستی حساس مورد استفاده قرار گیرد. nested RT-PCR به منظور مشاهده mRNA EGFRvIII در بافت گلیوما و میکروویکول های استخراج شده از نمونه سرم منجمد شده بدست آمده از همان بیمار مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های حاصل از ۳۰ بیمار، بدون اطلاع از نوع نمونه ها، مورد تحلیل قرار گرفته و واکنش های PCR برای هر نمونه حداقل سه مرتبه تکرار گردید. هیچ mRNA EGFRvIII در میکروویکول های سرم بدست آمده از ۳۰ فرد نرمال کنترل مشاهده نشد (D: نمایان شده، ND: نمایان نشده).

Patient number	Time of serum collection (days post-surgery)	Serum volume (ml)	Biopsy EGFRvIII	Serum microvesicle EGFRvIII
1	0	3	D	D
2	0	2	ND	ND
3	0	2.5	ND	ND
4	0	1	D	ND
5	0	1	D	ND
6	0	1	ND	ND
7	0	0.6	D	D
8	0	1	ND	ND
9	0	1	D	D
10	0	1	ND	D
11	0	2	D	ND
12	0	2	D	D
13	0	2	ND	D
14	0	2	D	D
15	0	2	ND	ND
16	0	2	ND	ND
17	0	1	D	ND
18	0	0.8	D	ND
19	0	1	ND	ND
20	0	1	ND	ND
21	0	1	ND	ND
22	0	1	ND	ND
23	0	1	ND	ND
24	0	1	ND	ND
25	0	1	ND	ND
26	14	0.6	D	ND
27	14	1.2	ND	ND
28	14	0.8	D	ND
29	14	0.9	D	ND
30	14	0.6	D	ND

این نشان می دهد که حداقل در برخی موارد، میکروویژیکول ها از طریق پروتئین های رگ زایی بصورت غیرمستقیم (میانجی گری) در رگ زایی اثر دارند.



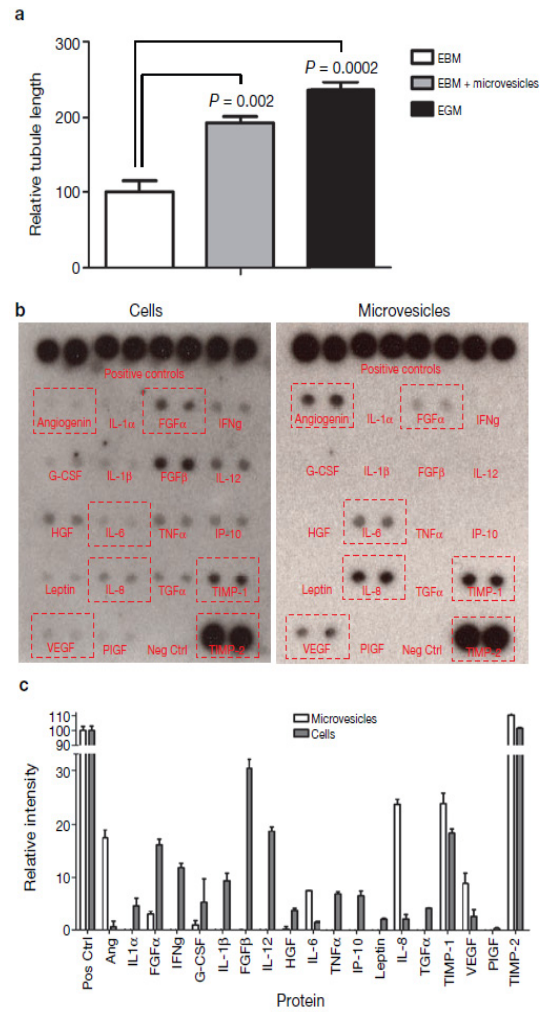
شکل ۳- میکروویژیکول های گلیوبلاستوما قادرند RNA عملکردی را به سلول های HBMVEC حمل نمایند. (a) میکروویژیکول های استخراج شده با رنگ غشایی PKH67 (سبز) نشاندار شده و به سلول های HBMVEC افزوده شدند. میکروویژیکول ها در عرض یک ساعت به درون ساختارهای شبه اندوزومی داخل شدند. (b) میکروویژیکول ها از سلول های گلیوبلاستوماپی که دارای بیان مداوم Gluc بودند استخراج گردیدند. استخراج RNA و RT-PCR مولکول های mRNA Gluc و GAPDH نشان داد که هر دو در داخل میکروویژیکول ها مجتمع اند. (c) میکروویژیکول ها سپس به سلول های HBMVEC افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. فعالیت Gluc در محیط کشت در ۰، ۱۵ و ۲۴ ساعت پس از افزودن میکروویژیکول ها اندازه گیری گردید. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{s.e.m.}$ نشان داده شده اند (n=۴).

سلول های گلیومای U87 انسان در محیط کشت نرمال یا محیط کشت تکمیل شده با میکروویژیکول های استخراج شده از سلول های گلیوبلاستوماپی اولیه، نگهداری شدند. پس از سه روز، یک افزایش ۵ برابری در تعداد سلول های U87 موجود در محیط نرمال رخ داد، در حالی که سلول هایی که در محیط دارای میکروویژیکول قرار داشتند به میزان ۸ برابر افزایش یافتند (اطلاعات تکمیلی، شکل ۴S). بنابراین، به نظر می رسد که میکروویژیکول های گلیوبلاستوما، سبب تحریک تکثیر در دودمان سلولی گلیومای گردند. این نتایج با توانایی میکروویژیکول های جدا شده از سلول های تومور برای بکار رفتن به عنوان وسایلی که بوسیله آن ها تومورها می توانند محیط شان را ویرایش و تغییر دهند و آن را برای رشد و تهاجم

میکروویژیکول های سرم حاصل از این بیماران در مقایسه با افراد کنترل وجود دارد (اطلاعات تکمیلی، شکل ۳S). بنابر این شناسایی RNA های خاص توموری موجود در میکروویژیکول های سرم، پنجره ای است رو به جهش های سوماتیک و تغییرات در بیان ژن در سلول های توموری. برای تشخیص این که آیا میکروویژیکول های گلیوبلاستوما می توانند در رگ زایی شرکت کنند یا نه، از سنجش رگ زایی در محیط *in vitro* استفاده نمودیم. سلول های HBMVEC در پلیت های پوشیده شده با ماتریل (Matrigel-coated) محتوی محیط کشت پایه اندوتلیال (EBM=endothelial basal medium) تکمیل شده با میکروویژیکول های تخلیص شده گلیوبلاستوما (EBM-supplemented) و یا EBM که فاکتورهای رشد رگ زایی به آن افزوده شده بودند (EGM) کشت گردیدند. در حضور میکروویژیکول ها، طول توبول HBMVEC ها در زمان ۱۶ ساعت به دو برابر افزایش یافت. این مشاهده با اثرات فاکتور های رگ زایی، قابل مقایسه بوده (شکل ۴a) و از نقش داشتن میکروویژیکول های مشتق از گلیوبلاستوما در شروع رگ زایی در سلول های اندوتلیال مغز حمایت می کند. برای توصیف بیشتر توانایی رگ زایی میکروویژیکول ها، ما سطوح پروتئین های رگ زایی را در میکروویژیکول ها تعیین کرده و آن ها را با سطوح موجود در (angiogenin)، سلول های دهنده گلیوبلاستوما با کمک آنتی بادی رگ زایی انسان مقایسه نمودیم (شکل ۴b). هفت مورد از نوزده پروتئین رگ زایی به راحتی در میکروویژیکول ها تشخیص داده شدند، در بین تمام انواع پروتئین های اساسی، شش مورد از آن ها شامل آنژیوژنین راحتی در میکروویژیکول ها تشخیص داده شدند، در بین تمام انواع پروتئین های اساسی، شش مورد از آن ها شامل آنژیوژنین (angiogenin) اینترلوکین ۶ (IL-۶)، اینترلوکین ۸ (IL-۸)، VEGF، TIMP-۱ و (TIMP-۲) در سطوح بالاتری نسبت به سلول های گلیوبلاستوما نمایان گردیدند (شکل ۴c). سه پروتئین رگ زایی غنی تر عبارت بودند از آنژیوژنین، IL-۶ و IL-۸ که هر سه، رگ زایی گلیومار پیچیده کرده و بدخیمی را افزایش می دهند (Brat et al., 2005; Eberle et al., 2000; Rollhion et al., 2001; Taraboletti et al., 2006).

رونوشت های mRNA موجود در میکروویکول ها در سطوح زمینه ای بالاتری نسبت به سلول ها نمایان شده اند. این تفاوت می تواند تا اندازه ای ناشی از فراوانی مقدار RNA ریپوزومی در سلول ها، در مقایسه با میکروویکول ها، باشد، درحقیقت فراوانی نسبی mRNA در هر μg کل RNA در میکروویکول ها بیشتر است. تحلیل هستی شناسی (ontology) نشان داده که در میکروویکول ها، سطوح بالایی از رونوشت های mRNA دخیل در مهاجرت سلولی، رگ زایی، تکثیر سلولی، پاسخ ایمنی و مدیفیکاسیون هیستون وجود دارند. به نظر می رسد که مولکول های miRNA موجود در میکروویکول ها به صورت هماهنگ در سلول های گلیوبلاستوما توزیع می شوند.

نشان داده ایم که میکروویکول های گلیوبلاستوما می توانند وارد سلول های HBMVEC شده و mRNA می گزارش گر حمل شده توسط میکروویکول ها ترجمه گردد. این مطلب پیشنهاد می کند که میکروویکول های مشتق شده از تومور می توانند محیط سلول های نرمال را از طریق تغییر در خصوصیات ترجمه شان تغییر دهند. علاوه بر این، نشان داده شده که میکروویکول های گلیوبلاستوما می توانند فنوتیپ رگ زایی را در سلول های نرمال اندوتلیال مغز تحریک کرده و در دیگر سلول های گلیوما سبب تحریک تکثیر گردند. علاوه بر نقش بالقوه مولکول های mRNA در این فرآیندها، میکروویکول ها همچنین محتوی تعدادی پروتئین های مربوط به رگ زایی همچون آنژیوژنین، $\text{FGF}\alpha$ ، $\text{IL}-6$ ، $\text{IL}-8$ ، $\text{TIMP}-1$ و VEGF می باشند. احتمالاً بیشتر این پروتئین ها با گیرنده های مشابه روی سطح سلول های اندوتلیال به منظور توسعه رگ زایی واکنش می دهند، و ممکن است که مستلزم تجزیه خارج سلولی میکروویکول ها باشد که منجر به آزادسازی پروتئین های درون آن ها می گردد. پیشنهاد شده که محیط اسیدی در تومورهای مستقر شده میتواند تجزیه برخی از میکروویکول ها را افزایش دهد و پروتئین های درون وزیکولی را برای مصارف زیستی در دسترس قرار دهد (Taraboletti et al., 2006). از طرف دیگر، پروتئین های



شکل ۴- میکروویکول های گلیوبلاستوما محتوی پروتئین های رگ زایی بوده و در محیط *in vitro* رگ زایی را تحریک می کنند. (a) سلول های HBMVEC بر روی محیط کشت پایه دارای ماتریکل (EBM) و یا تکمیل شده با میکروویکول های GBM و یا فاکتورهای رگ زایی (EGM) کشت شدند. تشکیل توبول پس از ۱۶ ساعت اندازه گیری گردید و داده ها به صورت mean \pm s.e.m. نمایان گردیدند. طول توبول با سلول های رشد داده شده در EBM مقایسه گردید (n=6). (b) پروتئین تام بدست آمده از سلول های گلیوبلاستومای اولیه و میکروویکول های حاصل از آن ها (۱ mg each) از طریق یک آرایه آنتی بادی رگ زایی انسان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. (c) آرایه ها اسکن گردید (scanned) و فراوانی آن ها با نرم افزار ImageJ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده ها به صورت mean \pm s.e.m. نمایان شده اند (n=4).

تومور بهینه تر سازند سازگار است. در این مطالعه میزان جدا شدن میکروویکول ها از سلول های گلیوبلاستومای انسان مورد بررسی قرار گرفته است. ویژگی های mRNA و miRNA موجود در این سلول ها و میکروویکول ها توصیف شده و نشان داده شد که در مقایسه با سلول های دهنده، mRNAهای خاصی در این میکروویکول ها به مقدار بسیار زیادی وجود دارند. در حقیقت، اکثر

نمونه سرم کنترل نرمال این مسئله قابل مشاهده نیست. نشان داده ایم که تومورهای مغزی، میکروویکول ها را به داخل رگ های سیستم گردش خون آزاد می کنند و قادریم از لحاظ ژنتیکی نوع EGFRvIII تومورهای گلیوبلاستوما را از طریق انجام nested RT-PCR بر روی RNA موجود در میکروویکول های استخراج شده از مقدار کمی از سرم بیمار، در مقایسه با روش های دیگر که در آن ها نیاز به جراحی مغز است، تشخیص دهیم. حساسیت این سنجش ممکن است که به فاکتور هایی همچون سایز تومور، موقعیت تومور، حجم سرم، کیفیت روش استخراج RNA، تغییر و تبدیل cDNA و PCR استفاده شده وابسته باشد. اطلاعات درباره وضعیت های EGFRvIII در بیماران گلیوبلاستومایی می تواند در توسعه آزمایشی واکسن EGFRvIII و دیگر کوشش های در زمینه درمان های کلینیکی سودمند باشد (Sonabend et al., 2007). مطالعه دیگری نشان داده است که سلول های گلیومای EGFRvIII مثبت (positive EGFRvIII) به اندازه ۵۰ بار بهتر از سلول های EGFRvIII منفی، به درمان با مهارکننده های EGFR، همچون erlotinib یا gefitinib، پاسخ می دهند (Mellinghoff et al., 2005). بنابراین ما یک روش جدید هدف گیری را برای مطالعه عوامل مولکولی ایجاد کننده سرطان پیشنهاد نمودیم که شامل، اما تنها محدود به این روش نمی شود، EGFRvIII، از طریق استخراج میکروویکول ها از سرم و تخلیص RNA به منظور نمایش و تشخیص جهش ها، اتصالات متفاوت و سطوح مولکول های mRNA و مولکول های miRNA مشخصه شکل گیری، پیشرفت و پاسخ به درمان تومور می گردد.

میکروویکول ها ممکن است وسایلی را فراهم کنند که تشخیص دهنده تکوین تغییرات ژنتیکی در ارتباط با پیشرفت تومور بوده و در این مسیر از نمونه های سرم که بصورت پیوسته گرفته شده استفاده می شود و احتمالاً از نوع سرطان و یا از مکانی که تومور در هر فرد در آن ناحیه متمرکز شده صرف نظر می شود. علاوه بر این، شناخت ژنوتیپ و فنوتیپ تومور که از آنالیز میکروویکول ها بدست آمده ممکن است به طراحی درمان های مناسب برای کوتاه کردن رشد تومور کمک نماید. در نهایت، ممکن است که سودمندی میکروویکول ها به عنوان وسایل

رگ زایی همچون آنژیوژنین، برای اعمال اثر زیستی شان مستلزم انتقال از عرض غشا می باشند (Xu et al., 2003)، عملی که می تواند به وسیله میکروویکول ها تسهیل شده باشد. بنابراین میکروویکول های تومور به عنوان یک وسیله انتقال چند جزئی برای حمل و نقل mRNA، miRNA و پروتئین ها، به منظور ارتباط اطلاعات ژنتیکی و نیز انتقال پروتئین های پیام رسان بین سلول های مجاور، عمل می نمایند.

این مطالعه، آنالیز کاملی از مولکول های mRNA می که در میکروویکول ها در مقایسه با سلول های دهنده غنی شده اند را نمایان می کند و پیشنهاد می کند که ممکن است یک مکانیسم سلولی برای تمرکز این پیام ها در درون میکروویکول ها وجود داشته باشد، احتمالاً در طول یک zip code در 3'-UTR، به عنوان مثالی از موارد توصیف شده mRNAهای ترجمه شده در موقعیت های خاص سلولی می توان از B-actin نام برد (Kislauskis et al., 1994). ساختار فضایی mRNAها در میکروویکول ها ناشناخته است اما آن ها ممکن است که به عنوان ذرات ریبونوکلئار نمایان باشند (RNPs) (Mallardo et al., 2003).

شواهد موجود پیشنهاد می کنند که رتروویروس ها، همچون HIV، می توانند از تشکیلات میکروویکول درون زاد (endogenous) برای جوانه زدن و تولید ذرات ویروسی جدید استفاده نمایند (Booth et al., 2006). به طور جالب توجهی، چندین توالی RNA رتروویروسی درون زاد بسیار غنی شده در میکروویکول ها کشف گردیده است (اطلاعات تکمیلی، جدول S۲). RNA کشف شده در میکروویکول ها محتوی تصویری لحظه ای (snapshot) از یک نظم قابل ملاحظه ترانسکریپتوم سلولی (cellular transcriptom) در هر زمان بدست آمده است. در بین مولکول های mRNA بدست آمده از میکروویکول های مشتق شده از گلیوبلاستوما، mRNAی EGFR به طور ویژه ای بصورت تنوعی از اتصالات در نواحی جهش یافته EGFRvIII در تعداد زیادی از گلیوبلاستوماها کشف گردیده است (Nishikawa et al., 2004). با استفاده از (angiogenin)، nested RT-PCR ما قادر خواهیم بود که پیام EGFR را در بیوپسی تومور و میکروویکول های حاصل از بیماران گلیوبلاستومایی تمیز دهیم اما در ۳۰

۱-۱۵ در محیط کشت فاقد میکروویکول (DMEM محتوی ۵٪ dFBS) کشت گردیدند و محیط کشت شرطی شده حاصل از 4×10^7 سلول پس از ۴۸ ساعت جمع آوری گردید. به طور مختصر، محیط کشت شرطی شده گلیوبلاستوما به منظور حذف آلودگی های سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰ g سانتریفیوژ گردید. رو شناور (supernatant) به میزان بیشتری در مدت ۲۰ دقیقه در ۱۶/۵۰۰ g سانتریفیوژ گردید و بوسیله یک فیلتر $0.22 \mu m$ خالص سازی شد. میکروویکول ها از طریق اولتراسانتریفیوژ در ۱۱۰/۰۰۰ g برای مدت ۷۰ دقیقه ته نشین شدند. رسوبات میکروویکول در ۱۳ میلی لیتر PBS شسته شدند و رسوبات مجدداً در PBS به حالت معلق درآمدند. با استفاده از سنجش پروتئین DC (Bio-Rad)، محتوای پروتئینی میکروویکول ها اندازه گیری گردید. میکروویکول های سرم بدست آمده از افراد سالم کنترل و بیماران گلیوبلاستوما با ۱۳ ml از PBS رقیق گشته و قبل از سانتریفیوژ بصورت استریل خالص گردیدند.

استخراج RNA. برای ارزیابی این مطلب که آیا RNA در درون میکروویکول ها موجود است یا نه، RNase A (fermentas) به سوسپانسیون میکروویکول ها در غلظت نهایی $100 \mu g/ml^{-1}$ اضافه شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در $37^\circ C$ گرمادهی گردید. سپس RNA تام با استفاده از کیت استخراج RNA (Ambion) MirVana برطبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. RNA با استفاده از Thermo Fischer Scient -) nanodrop ND -1۰۰۰ از نظر کمی بررسی گردید. نمونه بافت های زنده توموری که سریعاً منجمد شده اند برطبق توصیه شرکت سازنده بر روی RNAlater ICE ذوب گردیدند (Ambion) و متعاقب آن استخراج RNA بوسیله کیت استخراج RNA (Ambion) MirVana انجام گرفت.

تجزیه وتحلیل ریز آرایه. آزمایشات ریز آرایه بوسیله Miltenyi Biotech (Auburn) با استفاده از ریز آرایه Agilent ژنوم انسان، $4 \times 4 K$ ، با آرایه دو رنگ انجام گرفت. آرایه بر روی دو RNA یی که بصورت متفاوتی آماده سازی شده بودند و از سلول های گلیوبلاستوما اولیه و میکروویکول هایشان استخراج شده بودند انجام گردید. داده ها با استفاده

حامل کننده مولکول های RNA و پروتئین های درمانی اثبات گردید.

روش ها

جمع آوری نمونه های تومور و سرم از بیماران دچار تومور مغزی (گلیوبلاستوما). برای کشت سلول، نمونه های تومور مغزی از بیمارانی که توسط یک نوروپاتولوژیست به عنوان افراد دچار گلیوبلاستوما (مولتی فرم) تشخیص داده شدند بصورت مستقیم از طریق جراحی گرفته شد و در محیط کشت پایه عصبی (neurobasal) استریل سرد (Invitrogen) قرار داده شد. نمونه ها با استفاده از کیت (Miltenyi Biotech) تفکیک کننده بافت عصبی در زمان یک ساعته جراحی به صورت سلول های منفرد تفکیک گردیدند و در محیط DMEM محتوی ۵٪ FBS (ماده شده از طریق التراسانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ g برای ۱۶ ساعت و حذف میکروویکول های گاوی) تکمیل شده با پنی سیلین استرپتومایسین ($10 \mu g/ml^{-1}$ and $10 IU/ml^{-1}$, Sigma-Aldrich) قرار گرفتند. نمونه های یخ زده تومور و سرم حاصل از بیماران گلیوبلاستوما تایید شده از بخش جراحی عصب (Massachusetts General Hospital, Boston, MA (VU Medical Center, Amsterdam, The Netherlands) بدست آمدند. این نمونه ها تا هنگام استفاده در دمای $80^\circ C$ - نگه داشته شدند.

میکروسکوپ الکترونی نگاره. سلول های گلیوبلاستومای انسان بر روی لامل های (coverslips) پوشیده شده با اورنیتین قرار گرفته و در تثبیت کننده $0.5 \times$ کارنوفسکی (Karnovsky's fixative) فیکس شده و سپس دو مرتبه برای مدت ۵ دقیقه شسته شدند. سلول ها در یک سری صعودی غلظت اتانول آگیری گردیدند: ۱۰ دقیقه در ۳۵٪، 2×10 دقیقه در ۵۰ و ۷۰ و ۹۵٪ و 4×10 دقیقه در اتانول ۱۰۰٪. سلول ها سپس به Tousimis SAMDRI-795 semi-automatic Critical Point Dryer انتقال یافت و نهایتاً در High Resolution Ion Beam Coater ۶۸۱ با کروم پوشیده شد.

استخراج میکروویکول. سلول های گلیوبلاستوما در پاسژهای

میکروویژیکول های گلیوبلاستوما ی تخلیص شده، بوسیله کیت نشاندارکننده فلورسنت سبز PKH۶۷ (Sigma-Aldrich) همانطور که قبلا توصیف کردیم نشاندار گردیدند. میکروویژیکول های مدت ۱ ساعت گرمادهی گردیدند. RT PCR و nested PCR RNA با استفاده از کیت استخراج RNA MirVana تخلیص گردید. RNA با استفاده از کیت Omniscript RT (هنگامی که مقدار مواد اولیه در هنگام شروع $50 > \text{ng}$ بود) به cDNA تبدیل شد (Qiagen) که این عمل با نشاندار شده در محیط کشت با سلول های HBMVEC گرمادهی شدند ($5 \mu\text{g}$ در هر 50000 سلول). میکروویژیکول ها برای مدت ۲۰ دقیقه در 4°C اجازه اتصال یافتند و سلول ها سپس شسته شده و در دمای 37°C به استفاده از مخلوطی از الیگونوکلوئوتیدها و یک پرایمر هگزامر اتفاقی طبق پیشنهاد شرکت سازنده انجام گردید. پرایمرهای استفاده شده در روند PCR عبارت بودند از:

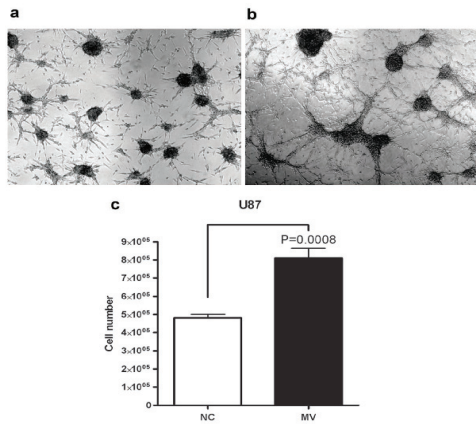
forward: 5`-GAA GGT GAPDH پرایمرهای, reverse: 5`-TCA-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3` ; EGFR/EGFRvIII PCR1, forward 5`-CCA GTA TTG ATC GGG AGA GC-3`, reverse 5`-GAG TAT GTG TGA AGG AGT-3`. EGFR/EGFRvIII PCR2, forward ,5`-ATG CGA CCC TCC GGG ACG-3 reverse 5`-GAG TAT GTG TGA AGG AGT-3 پرایمرهای Gluc قبلا توصیف شده اند. روند انجام PCR عبارت بود از: ۳ دقیقه در 94°C ; ۴۵ ثانیه در 94°C و ۴۵ ثانیه در 72°C و ۲ دقیقه در 72°C برای ۳۵ سیکل؛ ۷ دقیقه در 72°C . آرایه آنتی بادی رگ زایی. کل پروتئین تام (۱ mg) حاصل از سلول های گلیوبلاستوما ی اولیه یا میکروویژیکول های استخراج شده تخلیص شده از سلول های مشابه در بافر لیزکننده (Promega) لیز گردیدند و سپس طبق پیشنهاد شرکت سازنده به آرایه آنتی بادی رگ زایی انسان افزوده شدند (Panomics)، آرایه ها با نرم افزار ImageJ اسکن شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (NIH). ارقام. آنالیزهای آماری بوسیله students t-test انجام گردید.

از نرم افزار GeneSifter مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (Vizxlabs). نرم افزار Intersector (Vizxlabs) به منظور استخراج ژن هایی که کاملا بر روی هر دو آرایه تشخیص داده شده اند مورد استفاده قرار گرفت.

RT-PCR کمی miRNA RNA تام بوسیله کیتاستخراج RNA MirVana جداسازی گردید. RNA تام (30 ng) با استفاده از پرایمرهای مولکول های miR (Applied Biosystems) به cDNA تبدیل شد و برطبق دستورالعمل شرکت سازنده به میزان بیشتری تکثیر یافت. سنجش رگ زایی HBMVEC در محیط *in vitro* HBMVEC ها (30,000; catalog Cell Systems, gue no. ACBRI-376) بر روی چاهک های پوشیده با ماتریژل در ظرف ۲۴ خانه ای در محیط کشت پایه (Lonza Biologics)، یا در محیط کشت تکمیل شده با میکروویژیکول های گلیوبلاستوما ($7 \mu\text{g per well}$)، و یا در محیط کشت دارای مخلوطی از فاکتورهای رگ زایی (EGM; hydrocortisone, EGF, FGF, VEGF, IGF,) ascorbic acid, FBS and heparin; Singlequots (from Lonza) کشت گردیدند. تشکیل توبول پس از ۱۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و با نرم افزار ImageJ تجزیه و تحلیل گردید (NIH).

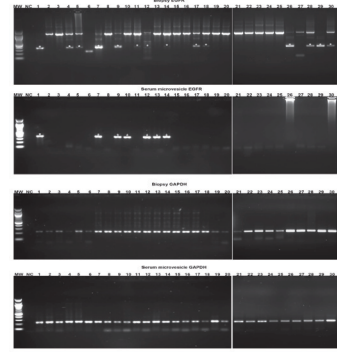
سنجش ترجمه mRNA Gluc. سلول های گلیوبلاستوما ی اولیه انسان با یک وکتور لنتی ویروسی خود غیرفعال کننده بیان کننده Gluc ترشخی تحت پروموتور سایتومگالوویروس (Badr et al., 2007) برای رسیدن به آلودگی با کارایی بیش از ۹۵٪ آلوده شدند. سلول ها به صورت پایداری آلوده شده و میکروویژیکول های تولید شده در طول پاساژهای بعدی (۲-۱۰) استخراج شده و به صورتی که قبلا بیان گردید تخلیص شدند. میکروویژیکول ها ($50 \mu\text{g}$) به 50000HBMVEC افزوده شده و برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند. فعالیت Gluc در روشنآور، پس از افزودن میکروویژیکول (0h) و ۱۵ و ۲۴ ساعت پس از آن مستقیما اندازه گیری شده و سپس نسبت به فعالیت Gluc در میکروویژیکول ها به صورت متعارف در آمد. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{s.e.m}$. نمایان شده است ($n = 4$). میکروویژیکول های نشاندار شده با PKH ۶۷

موارد الحاقی. داده های ریزآرایه در NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) ذخیره شده و در طول سری های GEO با شماره ورود GSE۱۳۴۷۰ قابل دسترسی می باشد. نکته: اطلاعات تکمیلی بر روی وب سایت Nature Cell Biology موجود می باشد.

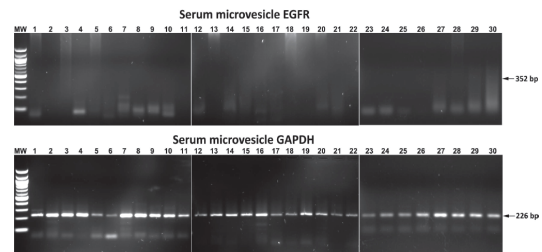


شکل ۴- میکروویکول های استخراج شده از سلول های گلیوبلاستوماى اولیه، تکثیر دودمان سلولی گلیوبلاستوماى U87 را افزایش می دهند. ۱۰۰,۰۰۰ سلول U87 در چاهک های ظرف کشت ۲۴ خانه ای کاشته شدند و برای سه روز اجازه رشد یافتند در (a) محیط کشت نرمال رشد (DMEM-۵٪ FBS) یا (b) محیط کشت نرمال رشد تکمیل شده با ۱۲۵ μg میکروویکول (MV). (c) پس از سه روز، سلول های موجود در محیط کشت تکمیل شده به ۴۸۰,۰۰۰ سلول رسیدند، در حالی که سلول های موجود در محیط کشت تکمیل شده با میکروویکول به ۸۷۰,۰۰۰ سلول افزایش یافتند.

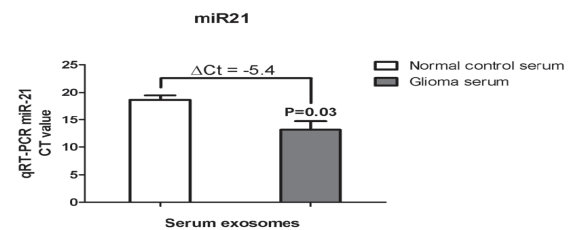
جدول تکمیلی ۱. ژن هایی که سیگنال با فراوانی بالاتر از پس زمینه (با اطمینان ۹۹٪) را در میکروویکول ها، نه در سلول های دهنده GBM، نشان می دهند نمایش داده شده اند. نتایج حاصل از دو آرایه (۱-۳، ۱-۴) به خوبی نمایانگر ژن های عمومی مربوط به هر دو لیست است. جدول تکمیلی ۲. ژن های حاصل از آرایه بر اساس فراوانی شان در میکروویکول ها دسته بندی گردیده اند. نسبت بین میکروویکول و سلول محتوی آن نیز نشان داده شده است. جدول تکمیلی ۳. هستی شناسی رونوشت های mRNAی که به میزان بیش از ۱۰ برابر غنی شده یا کاهش یافته اند، لیست شده است (p-value < ۰.۰۵). میزان Z (Z-score) نشان می دهد که آیا موجودیت ژن خاص در نهایت بیشتر از میزان مورد انتظار براساس شانس است یا کمتر. مقادیر مثبت بیش از ۲ نمایانگر میزان نهایی بیش از مقدار مورد انتظار و مقادیر کمتر از ۲- بیانگر کمتر بودن نتیجه نهایی نسبت به میزان مورد انتظار است.



شکل ۵- nested RT-PCR برای تشخیص mRNA EGFRvIII در نمونه تومور و اکسوزوم های سرم مربوط به همان نمونه استفاده گردید. محصول PCR نوع وحشی EGFR به صورت یک باند در ۳۵۲ bp و EGFRvIII در ۱۱۵۳ bp نمایان گردید. RT-PCR mRNA می GAPDH به عنوان کنترل مثبت به کار رفت (۲۲۶ bp). EGFRvIII با یک ستاره نشان داده شده است. بیماران ۱۱ و ۱۲ و ۱۴ تنها افزایش ضعیف را در نمونه تومور نشان داده اند در حالی که زمانی که نمونه های بیشتری بارگذاری گردیدند افزایش واضح تری نمایان گردید.



شکل ۶- nested RT-PCR برای EGFRvIII بر روی میکروویکول های بدست آمده از سرم ۳۰ فرد نرمال کنترل انجام گرفت. EGFRvIII (۳۵۲ bp) هرگز در سرم افراد نرمال یافت نشد. PCR بر روی GAPDH (۲۲۶ bp) بعنوان کنترل انجام گردید.



شکل ۷- RT-PCR کمی برای اندازه گیری سطوح miR21 موجود در اکسوزوم های حاصل از سرم بیماران گلیوبلاستوما یا افراد نرمال کنترل استفاده گردید. سرم گلیوبلاستوما یک کاهش ۵/۴ برابر را در میزان سیکل آستانه (ct-value) نشان داد، که تقریباً با افزایش ۴۰ برابری miR21 (۲) مطابقت دارد. سطوح miR21 در مورد هر نمونه نسبت به GAPDH بهینه سازی گردید (n=۳).

References

- 1- Al-Nedawi, K and et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biol*, 2008;10,619-624
- 2- Badr C E, Hewett J W, Breakefield X O and Tannous B A. A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and ER stress. *PLoS ONE*, 2007; 2,e571.
- 3- Baj-Krzyworzeka, M., et al. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 2006 55, 808–818.
- 4- Booth, A M and et al. Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol*, 2006 ;172, 923–935.
5. Brat D J, Bellail A C and Van Meir, E. G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology* , 2005;7, 122–133.
- 6- Carmeliet P and Jain R K Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000 ;407,257–249
- 7- Chan J A, Krichevsky A M and Kosik K S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005; 65, 6029–6033.
- 8- Chaput N, Taieb J Andre F and Zitvogel, L. The potential of exosomes in immunotherapy. *Exp. Opin Biol Ther*, 2005; 5, 737–747.
- 9- Clayton A , Mitchell J P Cour J, Mason M D and Tabi Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res*, 2007; 67,7466–7458 .
- 10- Delves G H, Stewart A B, Cooper A J and Lwaleed B A Prostatosomes, angiogenesis, and tissue factor. *Semin. Thromb Hemost*, 2007; 33, 75–79 .
- 11- Eberle K and et al. The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells. *Anticancer Res*, 2000; 20, 1679–1684.
- 12- Gabrilovich D I Molecular mechanisms and therapeutic reversal of immune suppression in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2007;7, 1 .
- 13- Ginestra A and et al. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res*, 1998; 18, 3433–3437 .
- 14- Greco V, Hannus M and Eaton S Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* 106, 2001; 633–645 .
- 15- Janowska-Wieczorek A and et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer*, 2005; 113, 752–760 .
- 16- Kislauskis E H, Zhu X and Singer R H Sequences responsible for intracellular localization of β -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol*, 1994; 127, 441–451.
- 17- Liu C and et al. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK

cell function. *J Immunol*, 2006; 176, 1375–1385 .

18- Mack M and et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membranederived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nature Med*, 2000; 6, 769–775.

19- Mallardo M and et al. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl Acad Sci, USA* , 2003;100, 2100–2105 .

20- Mazzocca A and et al. A secreted form of ADAM9 promotes carcinoma invasion through tumor stromal interactions. *Cancer Res*, 2005; 65, 4728–4738.

21- Mellinshoff I K and et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *New Engl J Med*, 2005; 353, 2012–2024.

22- Millimaggi D and et al. Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia*, 2007; 9, 349–357.

23- Muerkoster S and et al. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1 β . *Cancer Res*, 2004;64, 1331–1337

24- Nishikawa R and et al. Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, δ EGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol*, 2004; 21, 53–56 .

25- Pan B T and Johnstone R M . Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33, 1983; 967–978 .

26-Pelloski C E and et al. Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma. *J Clin Oncol*, 2007; 25, 2288–2294.

27- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak M Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cellto- cell communication. *Leukemia*, 2006 20, 1487–1495.

28-Rolhion C and et al. Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas. *J Neurosurg*, 2001; 94, 97–101.

29- Singer C F and et al. Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res, Treat*, 2008; 110, 273–281.

30- Stupp R and et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New Engl J Med*, 2005; 352, 987–996.

31-Sonabend A M, Dana, K and Lesniak M S. Targeting epidermal growth factor receptor variant III: a novel strategy for the therapy of malignant glioma. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2007; 7, S45–S50.

- 32- Tannous B A, Kim D E, Fernandez J L, Weissleder R and Breakefield X O. Codonoptimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther*, 2005; 11, 435–443.
- 33-Taraboletti G and et al. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* , 2006;8, 96–103 .
- 34- Thery C, Zitvogel L and Amigorena S Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Rev. Immunol*, 2002; 2, 569–579.
- 35- Valadi H and et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biol*, 2007; 9, 654–659.
- 36- Wieckowski E and Whiteside T L. Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles. *Immunol Res*, 2006; 36, 247–254.
- 37- Xu Z P, Tsuji T, Riordan J F and Hu G F Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochem*, 2003;42, 121–128.