

بررسی ارتباط ژن SOX2 و ژنهای تارگت مسیر Notch در سرطان مری

مریم نجفی^۱، معین فرشچیان^۲، اسماعیل رستمی^۳، غلامرضا کرمی معدنی^۴، ابوالفضل راد^{۵*}

^۱ کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

^۲ استادیار گروه تحقیقات پزشکی مولکولی، جهاد دانشگاهی، مشهد، ایران

^۳ مربی گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

^۴ کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، بیمارستان واسعی، بخش ICU، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

^۵ مربی گروه بیوشیمی و تغذیه، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: سبزوار، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، ابوالفضل راد

E-mail: Rad6790@yahoo.com

وصول: ۹۴/۲/۱۲، اصلاح: ۹۴/۵/۲۰، پذیرش: ۹۴/۷/۱

چکیده

زمینه و هدف: سرطان مری ششمین عامل مرگ در جهان می باشد. با وجود درمان هایی همچون شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی طول عمر بیماران بعد از شناسایی بسیار کوتاه دارد. از سویی شناسایی، پیشگیری و درمان بموقع نیاز به مشخص کردن مسیرهای مولکولی این نوع سرطان می باشد. در این مطالعه بمنظور مشخص شدن هر چه بیشتر مسیر رشد و نمو (development) با هدف قرار دادن فاکتور رونویسی SOX2 در یکی از رده های سلولی سرطان مری، نقش این فاکتور و مسیر را در ارتباط با مسیر Notch سنجیده شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه افزایش نابجای فاکتور SOX2 توسط وکتور لنتی ویروسی و ترانسداکت سلولهای تارگت انجام شد. در ادامه افزایش نابجای بیان ژن SOX2 با تکنیک real time PCR تایید گردید. در نهایت اثر افزایش بیان این فاکتور بر روی ژن های پایین دست توسط سنجش بیان به روش relative real time PCR نشان داده شد.

یافته ها: افزایش بیان SOX2 در رده سلولی KYSE 30 موجب افزایش بیان فاکتورهایی که تارگت notch سیگنالینگ هستند، می شود.

نتیجه گیری: داده های ما نشان می دهد که افزایش بیان SOX2 در افزایش بیان ژنهای HEY1 و HEY2 نقش دارد و این کمک به حفظ حالت stemness در سلولهای سرطانی مری میکند. مطالعات بیشتری نیاز است تا این ژنها بعنوان مارکر شناسایی و پیشگیری از سرطان مری معرفی گردد.

واژه های کلیدی: سلولهای سرطانی سنگفرشی مری، SOX2، HEY1، HEY2

مقدمه

(۱). این نوع سرطان از نظر ویژگی های بافتی و رفتار بیولوژیکی متفاوت از سلولهای غیر سرطانی می باشد. شایع ترین نوع سرطان مری از نظر بافتی سلولهای کارسینومای سنگفرشی مری (ESCC) می باشد که بصورت کمربندی از چین تا ایران کشیده شده است (۲).

سرطان مری یکی از عامل های مهم مرگ و میر مرتبط با سرطان در ایران می باشد. از نظر شیوع در زنان پنجم و در مردان رت به ششم در میان سرطان ها طبقه بندی می شود

اولیه، همچنین در حفظ تعادل تکثیر سلولی، تمایز و آپتوز دارد (۱۴). فاکتورهای متعددی در این مسیر نقش دارند که نشان دادند این فاکتورها در سرطان های مختلف نقش دارند.

در این مطالعه با افزایش نابجای بیان ژن SOX2 در رده سلولی KYSE 30 نشان داده شد که این افزایش در مسیر سیگنالینگ Notch می تواند تاثیر داشته باشد و پیش بینی می شود از این طریق در حفظ حالت stemness سلولهای بنیادی سرطان نقش داشته باشند.

مواد و روشها

رده های سلولی و آماده سازی سلولها:

دو رده ی سلولی KYSE 30 و HEK293T که از بانک سلولی انیستیتو پاستور تهران خریداری شد و در شرایط زیر کشت داده شدند: برای رده ی سلولی KYSE 30 از محیط RPMI 1640 و برای سلول HEK293T از محیط DMEM استفاده شد. هر دو سلول در انکوبه ۳۷ درجه با ۵ درصد CO2 و در محیط به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین استرپتومایسین کشت داده شدند.

تولید ویروس در رده سلولی HEK293T و ترانسداکشن سلول های KYSE 30 بعنوان هدف:

بمنظور تولید ویروس از سه وکتور pLenti-III-UbC-Sox2، psPax2 و pMD2/G استفاده شد که برای شروع کار لازم بود این وکتورها در غلظت بالا استخراج شوند. بعد از تعیین غلظت دقیق توسط نانودراپ، هر یک از سه وکتور، بصورت همزمان سه وکتور با روش کلسیم فسفات طبق پروتوکول کتاب current protocol در سلول HEK293T ترانسفکت شدند. بعد از ۲۴ ساعت تولید ویروس با سبز شدن سلولها توسط بیان ژن GFP مشخص شد، نور سبز سلولها توسط میکروسکوپ فلورسنت مدل optic عکس گرفته شد (شکل ۱). محیط رویی سلولهای ترانسفکت شده بعد از ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت

امروزه از دیدگاه کلینیکی درمان با داروهای شیمیایی و رادیوتراپی بعنوان یک درمان استاندارد شناخته شده است. همچنین افرادی که این نوع داروها را دریافت می کنند، ارزیابی بافتی این افراد انجام می گیرد تا بعنوان جواب دارو شناخته شود. از سویی عود سلولهای سرطانی بعد از درمان که از طریق سلولهای سرطانی زنده تخمین زده می شود بعنوان فاکتورهای پیش آگهی در نظر گرفته می شوند. فهم هر چه بیشتر سرطان مری از دیدگاه مولکولی کمک به پیش بینی در پیش آگهی بیماران از طریق پیشرفت در شناسایی، پیشگیری و همچنین درمان این اختلال خواهد داشت.

سلولهای بنیادی سرطان (cancer stem cells or CSCs) بعنوان زیر مجموعه ای از سلولهای سرطانی فاکتور مهمی در پیش آگهی و انتخاب درمانی هستند (۳). شناسایی فاکتورهای مرتبط با CSCs می تواند برای شناسایی و درمان کاربرد بسیاری داشته باشد. از فاکتورهای شناخته شده مرتبط با CSCs می توان SOX2، OCT4، NONOG، KLF4 و ... را نام برد (۴)(۵). ارتباط مسیرهای سیگنالینگ مختلف با این فاکتورها نشان داده شده است که نقش حفظ حالت Self renewal را برای سرطان حفظ می کنند. در میان این فاکتورها، SOX2 فاکتور مهمی است که هم در رشد و نمو طبیعی و هم در خودتجدیدی (Self renewal) سلولهای بنیادی رویانی نقش دارد (۶). با وجود این بهم ریختگی بیان این فاکتور در سرطانهایی همچون ریه (۷)، پستان (۶)، پروستات (۸)، گلیوبلاستوما (۹)، کولورکتال (۱۰)، تخمدان (۱۱) و مری (۱۲) دیده شده است. با وجود نشان دادن این بهم ریختگی هنوز مکانیسم اصلی نحوه ی عملکرد این فاکتور مشخص نشده است.

دو فاکتور HEY1 و HEY2 از تارگت های مسیر سیگنالینگ Notch می باشند (۱۳). سیگنالینگ Notch یکی از مسیرهای سلولی مهم است که در رشد و نمو اثر مهمی دارد. این مسیر نقش های مهمی در حفظ سلولهای بنیادی

PCR و با روش SYBR green ارزیابی شد (پرایمرها توسط نرم افزار آنالیز primer3 طراحی شدند). داده های بیانی با گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (GAPDH) که کمترین تغییر را بین سلولهای ترانسفکت نشده و سلولهای مداخله شده داشت نرمالیز شد. شرایط دمایی و زمانی real time PCR بصورت زیر بود: 95 C (10 min), ۳۹ جرخه با شرایط (95 C (20 S), 57 C (30 s), 72 C (30 s).

آنالیز آماری:

برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. داده های مستخرج از بیان ژنها با تست T test آنالیز شدند.

یافته ها

بعد از افزایش نابجای SOX2 در رده سلولی KYSE 30، فاکتورهای مرتبط با Notch سیگنالینگ در این رده سنجیده شد. نتایج نشان داد که دو ژن HEY1 و HEY2 که جز تارگت های Notch می باشند بعد از افزایش بیان SOX2 افزایش معنی داری داشتند (P=0.004) (شکل ۲). این نتایج نشان دهنده ی ارتباط مسیر Notch با

جمع آوری شد و بمنظور تغلیظ ویروسها در دور با سرعت ۱۰۰ هزار g به مدت ۱ ساعت ونیم در لوله های مخصوص سانتریفوژهای اولترا سانتریفوژ شدند. ویروس غلیظ شده بر روی سلولهای KYSE 30 که از یک روز قبل پاساژ داده شده بودند و در حد ۵۰ تا ۷۰ درصد هر یک از خانه های پلیت ۶ خانه ای را گسترش داده شده بودند، اضافه گردیدند. سلولها در شرایط قبلی انکوبه شدند.

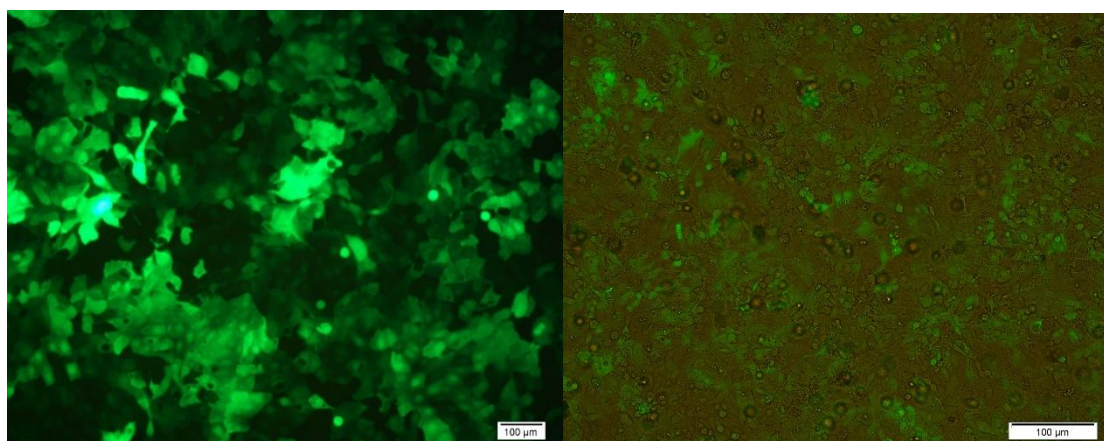
استخراج RNA و سنتز cDNA:

برای استخراج RNA از کیت Tripure شرکت Roch طبق دستور پرتوکل شرکت استفاده شد. درستی استخراج با ران کردن روی ژل ۱ درصد تعیین گردید. در ادامه RNA استخراج شده با Dnase I (شرکت فرمنتاس) طبق دستورالعمل کیت تیمار گردید. در نهایت از RNA تیمار شده سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت تاکارا) انجام شد.

سنجش بیان ژن SOX2, HEY1,2 با تکنیک Comparative Real time PCR: بیان ژن های SOX2, HEY1 و HEY2 توسط پرایمرهای مربوطه (جدول ۱)، توسط تکنیک real time

جدول ۱: جفت پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Primer name	Forward	Reverse
SOX2	AGCTACAGCATGATGCAGGA	GGTCATGGAGTTGTA CTGCA
HEY1	ACGAGAATGGAAACTTGAGTTC	AACTCCGATAGTCCATAGCAAG
HEY2	ATGAGCATAGGATTCCGAGAGTG	GGCAGGAGGCACTTCTGAAG
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTC



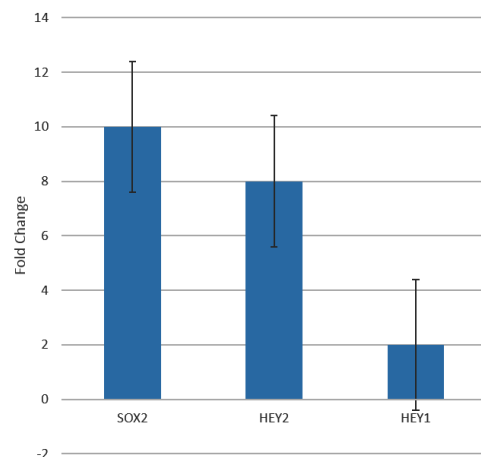
شکل ۱: سلولهای HEK293T که با مارکر بیانی GFP با تابش تور فلورسینس به رنگ سبز دیده می شوند که نشان دهنده ی تولید ویروس می باشد. (سمت چپ: نور مریی و فلورسنت همزمان، سمت راست: تنها نور فلورسنت)

ضروری می باشد.

فاکتور SOX2 یکی از ژنهای مهم دخیل در مسیر نمو و رشد و حفظ سلولهای بنیادی می باشد. بهم ریختگی بیان این ژن در سرطان های مختلف دیده شده است. عباس زادگان و همکاران در سال ۲۰۱۴ ارتباط بین افزایش بیان SOX2 و SALL4 در سرطان مری را نشان دادند. همچنین مطالعات متعدد دیگری در جمعیت های دیگر افزایش بیان SOX2 را در سرطان مری نشان داده اند (۱۶).

در این مطالعه به منظور بررسی اهداف پایین دست SOX2، ابتدا رده سلولی که بیان ژن SOX2 کم نسبت به سل لاین های مری دیگر داشت (۱۲)، انتخاب گردید. با توجه به اینکه بیماران معمولا افزایش بیان این ژن را نشان می دهد، رده ی سلولی KYSE 30 می تواند کمک کننده باشد تا با افزایش بیان نابجا (ectopic) در این رده ی سلولی، بین محیط *in vitro* و *in vivo* شبیه سازی گردد.

بعد از افزایش بیان نابجا در رده سلولی KYSE 30، ژنهای کاندید مربوط به تارگت Notch انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که افزایش SOX2 باعث افزایش همزمان ژنهای تارگت Notch می شود. با توجه به مطالعه موسکاتو و همکاران این مسیر در حفظ سلولهای بنیادی از طریق فعال کردن خانواده ی HEY و HES نقش دارد (۱۷). لذا در تایید مطالعات قبلی، داده های ما نشان می دهد که SOX2 ممکن است با افزایش بیان خود و از طریق مسیر Notch کمک به حفظ سلولهای بنیادی بکند. با توجه به اینکه سلولهای بنیادی سرطانی (CSCs) بعنوان یک زیر مجموعه از سلولهای سرطانی در شروع و حفظ حالت سرطانی نقش مهمی را دارند (۱۸)، داده های ما نشان دهنده ی ارتباط بسیار خوبی برای هدف قرار دادن این سلولها می باشند. مطالعه بیان ژن HEY1 و HEY2 در بیماران سرطان مری افزایش بیان این دو ژن را نشان می



شکل ۲: با افزایش نابجای ژن SOX2، ژنهای HEY2 و HEY1 افزایش بیان پیدا کرده اند. (P=0.004)

ژنهای نگهدارنده حالت بنیادی سلولها می باشد و احتمالاً این مسیر سیگنالینگ از این طریق در رشد، نمو و حفظ حالت خودتجدیدی سلولهای بنیادی نقش خود را ایفا می کند.

بحث

سرطان مری ششمین عامل مرگ در جهان می باشد (۱۵). با وجود درمان های امروزی که شامل شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی می باشد، عمر مفید این افراد بعد از تشخیص کمتر از ۵ سال می باشد. با شناسایی مسیرهای مولکولی می توان افراد خانواده های درگیر را پیگیری نمود و بموقع مراحل پیشگیری، شناسایی و درمان در مراحل اولیه را انجام داد.

مسیرهای مختلف سیگنالینگ در دوره های متفاوتی از زندگی انسان فعال هستند و بطور طبیعی باعث تکامل و رشد انسان می شوند. اختلال در بیان و عملکرد فاکتورهای مربوط با این مسیرها موجب اختلالات و بیماریهای مثل سرطان می شود. فهم کامل این مسیرها و ارتباط این مسیرها با یک دیگر کمک حیاتی به درمان سرطان خواهند داشت. بطور معمول سرطان در اثر اختلال یا جهش های متعدد در چند فاکتور مختلف بوجود می آید، لذا پیدا کردن ارتباط این فاکتورها بعد از اختلال

را اثبات نماید.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی سبزوار بخاطر حمایت مالی این پروژه تحقیقاتی قدردانی و تشکر می شود.

دهد (۱۳)، از سویی چند مطالعه افزایش بیان ژن SOX2 را در سرطان مری نشان داده است (۱۲، ۱۶، ۱۹، ۲۰)، همچنین مطالعه داخل آزمایشگاه ما تایید کننده ی این می باشد که SOX2 بر افزایش بیان این دو تاثیر دارد. مطالعات بیشتری لازم است تا در مدل حیوانی این فرضیه

References

1. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Annals of Oncology*. 2009;20(3):556-63.
2. Sadjadi A, Marjani H, Semnani S, Nasserri-Moghaddam S. Esophageal cancer in Iran: A review. *Middle East Journal of Cancer*. 2010;1(1):5-14.
3. Nagata S, Hirano K, Kanemori M, Sun L-T, Tada T. Self-renewal and pluripotency acquired through somatic reprogramming to human cancer stem cells. 2012.
4. Mostafa Enayatrads HS. An investigation of changing patterns in breast cancer incidence trends among Iranian women. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2015;22.(۱)
6. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;383(2):157-62.
7. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F, et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC cancer*. 2011;11(1):42.
8. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics*. 2009;41(11):1238-42.
9. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, et al. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(4):230-8.
10. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PloS one*. 2011;6(11):e26740.
11. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Mejías-Luque R, et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC cancer*. 2011;11(1):518.
12. Ye F, Li Y, Hu Y, Zhou C, Hu Y, Chen H. Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(1):131-7.
13. Gen Y, Yasui K, Zen Y, Zen K, Dohi O, Endo M, et al. SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2010;202(2):82-93.
14. Forghanifard MM, Taleb S, Abbaszadegan MR. Notch Signaling Target Genes are Directly Correlated to Esophageal Squamous Cell Carcinoma Tumorigenesis. *Pathology & Oncology Research*. 2015;21(2):463-7.
15. Shih I-M, Wang T-L. Notch signaling, γ -secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer research*. 2007;67(5):1879-82.
16. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(2):74-108.
17. Forghanifard MM, Khaled SA, Javdani-Mallak A, Rad A, Farshchian M, Abbaszadegan MR. Stemness state regulators SALL4 and SOX2 are involved in progression and invasiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Medical Oncology*. 2014;31(4):1-8.
18. Katoh M, Katoh M. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International journal of oncology*. 2007;31(2):461-6.
19. Khosrojerdi F, KNS, Nabiuni M. Telomerase activity in breast cancer cells under treatment with crocin. *Quarterly Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*. 2012;19.(۳)
20. Saigusa S, Mohri Y, Ohi M, Toiyama Y, Ishino Y, Okugawa Y, et al. Podoplanin and SOX2 expression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemo-radiotherapy. *Oncology reports*. 2011;26(5):1069-74.
21. Rad A, Farshchian M, Forghanifard MM, Matin MM, Bahrami AR, Geerts D, et al. Predicting the molecular role of MEIS1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biology*. 2015:1-11.

Correlation of SOX2 and Notch Signaling in Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Maryam Najafi,

MSc, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Moein Farshchian.,

PhD, Molecular Medicine Research Department, ACECR-Khorasan Razavi branch, Mashhad, Iran

Esmail Rostami.,

Department of laboratory sciences, Faculty of Para- Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Gholamreza Karami madani.,

MSc, Vasea hospital, ICU, Sabzevar University of Medical Sciences, Iran.

***Abolfazl Rad.,**

Department of Biochemistry and Nutrition, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

Received:02/05/2015, Revised:11/08/2015, Accepted:23/09/2015

Corresponding author:

Abolfazl Rad,
Sabzevar University of Medical
Sciences, Sabzevar Abolfazl Rad
E-mail: Rad6790@yahoo.com

Abstract

Background and purposes: Esophageal Squamous cell carcinoma (ESCC) is ranked as the sixth cause of cancer-related death. However there are chemotherapy, radiotherapy and surgical as standard treatment, for this cancer the survival rate is lower. Therefore, clarification of molecular pathways are needed for diagnosis, prevention and treatment. In this study we aimed to evaluate the ectopic expression of SOX2 and its correlation with Notch signaling pathways.

Materials and Methods: Using lentiviral SOX2, we did transduction in KYSE 30 cells and over-expressed SOX2. Then, we confirmed the overexpression by Real time PCR. Also the correlation of SOX2 overexpression with Notch signaling factors was assessed by Real time PCR.

Results: The over-expression of SOX2 in KYSE 30 give rise to up-regulation of Notch signaling factors.

Conclusion: Our data showed, the overexpression of SOX2 causes overexpression of HEY1 and HEY2 which maintain stemness in ESCC. These concepts will require deeper studies to use as biomarker for ESCC.

Keywords: ESCC, SOX2, HEY1, HEY2