فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۱، جلد ۸، شماره۴، پائیز۹۴، صفحه ۳۱ تا ۳۶

مطالعه بافتی و معرفی ژن های feoB و fyuA سیدروفور در تومورهای سرطانی کولورکتال آلوده به اشریشیاکلی

صدیقه مهرابیان[۱]، منا هومن[۲]، شهلا محمد گنجی[۳]
۱– استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و دانشگاه خوارزمی، تهران. ایران mehrabians2012@yahoo.com
۲–کار شناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران–شمال، تهران. ایران.
۳–استادیار ژنتیک مولکولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران. ایران.

تاریخ دریافت:۹٤/۷/۱۲ تاریخ پذیرش:۹٤/۸/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان کولورکتال دومین سرطان رایج در جهان می باشد.دامنه تغییرات ژنتیکی در ایجاد سرطان کولورکتال وسیع بوده و بررسی ها نشان می دهد عفونت با نوع خاصی باکتری اشریشیا کلی در افراد مبتلا به بیماری التهاب روده به خصوص کولیت اولسراتیو می تواند باعث شروع سرطان کولورکتال شود. نوع خاصی از باکتری اشریشیا کلی سیدروفور با تولید انترو توکسین باعث اختلال در سیکل سلولی، شروع و توسعه سرطان کولورکتال می گردد. هدف از این مطالعه ارتباط سویه های اشریشیا کلی سیدروفور و سرطان کولورکتال است.

روش کار: بیو بسی از روده بزرگ مراجعه کنندگان به کلینیک گوارش شامل ۳۵ نمونه از افراد مبتلا به سرطان کولورکتال و ۳۵ نمونه از افراد سالم از نظر بیماری های روده ای و سرطان کولورکتال گرفته شد. پس از تهیه لام از بافت سالم و سرطانی، جدا سازی باکتری اشریشیا کلی و استخراج DNA با تکنیک Duplex PCR برای دو ژن feoB و fyuA به عنوان مارکر ژن های سیدروفور انجام شد.

یافته ها: از بافت سرطانی ۵۹/۳٪ و ۲۰٪ بافت سالم ژن feo B و برای ژن fyuA ۱٤/۸٪ در بیمار و ۸٪ درافراد سالم مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از بررسی این ژن ها در ایران نسبت به نتایج منتشر شده مشابه در کشورهای اروپایی فراوانی کمتری نشان می دهد.

واژه های کلیدی: اشریشیاکلی، انتروباکتین، سرطان کولورکتال.

مقدمه

سرطان کولورکتال دومین سرطان رایج در جهان است. دامنه تغییرات ژنتیکی در ایجاد سرطان کولورکتال بسیار وسیع بوده، لذا لازم است عوامل موثر دراین نوع سرطان مشخص شود. یکی از فاکتورهای ایجاد سرطان کولورکتال عفونت های باکتریایی است. نوع خاصی از باکتری سیدروفور با تولید انترو توکسین باعث اختلال در سیکل سلولی، شروع و توسعه سرطان کولورکتال می‌گردد(۶). با توجه به این که آهن چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین و دومین فلز فراوان در زمین است و غالباً برای باکتری‌ها همیشه یک سطح محدود کننده بوده و در محیط های هوازی در pH حدود ۷ یا بیشتر آهن به صورت نا محلول و در pH حدود ۳ یا کم تر به صورت محلول می باشد و موجودات زنده ای که در شرایط بسیار اسیدی رشد می کنند به ندرت مشکلی در به دست آوردن آهن دارند و باکتری ها نیاز به چند میلیون اتم آهن در هر سلول برای تولید سیتوکروم ها و خوشه های آهن و گوگرد در پروتئین های اکسیداسیون و احیا دارند(۲). در شرایط هوازی آهن محیط به صورت نامحلول است و باکتری مواد چلاته کننده ی خاص برای جدا کردن و جذب

آهن های محیط (chelating) را تولید می نماید. جرم مولکولی این عوامل چلاته کننده در حدود ۰/۵ تا ۱/۵ کیلو دالتون بوده و در مجموع از آن‌ها به عنوان سیدروفور یاد می شود(۳). کلمه سیدروفور مشتق شده از یک کلمه یونانی یه نام(حامل آهن) است. این مواد مولکول های هشت وجهی هستند که یون آهن در مرکز وجود دارد(۱). Fe^{3+} سیدروفورها با توجه به لیگاند آن ها با آهن(Fe^{3}) طبقه بندی می شوند که شایع‌ترین آن ها کاتکولات ها و هیدروکسامات ها می‌باشند(۵). نمونه هایی از سیدروفورهای تولید شده توسط قارچ ها سیدروفورهای هیدروکسامات و باکتری ها مانند اشریشیا کلی سیدروفورهای کاتکولات تولیدکننده انتروباکتین هستند. سیدروفورهای متصل به آهن از ترانسفرین یا لاکتوفرین، آهن می گیرند(۱۱). اتصال سیدروفورها به آهن با ثابت تفکیک ۲۲-۵۲ صورت می‌گیرد. بنابراین سیدروفورها آهن را به دست می آورند. زیرا میل ترکیبی سیدروفور برای Fe^{3+} بیشترتر از ثابت حلالیت برای ترکیبات آهن نا محلول می باشد. هنگامی که غلظت آهن محلول کمتر از ۱ میکرومولار است. اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا، کلبسیلا و انتروباکتر تولید انتروباکتین می کنند. خوشه ژن انتروباکتین ساکن بر روی کروموزوم در با کتری *E.coli* است که آن را برای فعالیت های سیدروفوری کد می‌نماید(۸). با توجه به شیوع بالا بیماری سرطان کولورکتال در جهان و در ایران و هم چنین عوامل متنوع و مختلف شروع این بیماری که در بین این موارد می توان به عامل باکتریایی اشاره کرد(۷). مطالعه بررسی ژن های دخیل در سیدروفور سویه های باکتری *E.coli* و هم چنین ژن‌های مرتبط با سیدروفورهای سویه های باکتری *E.coli* از جمله مواردی است که تاکنون در ایران برروی آن تحقیق انجام نشده است. مشخص نمودن درصد فراوانی این ژن ها در سویه های باکتری *E.coli* ساکن روده بزرگ بیماران مبتلا به بیماری های التهابی روده بزرگ و سرطان کولورکتال می تواند در کنترل این بیماری یا تخفیف حدت آن کمک موءثر نماید. از طرف دیگر با مشخص شدن رابطه بین فاکتورهای بیماری زایی باکتری *E.coli* و سرطان کولورکتال، می توان راه حلی برای از بین بردن عوامل مرتبط با این بیماری ارایه نمود(۸).

مواد و روش ها

استخراج DNA ژنومی از باکتری ها به روش جوشاندن.

انجام PCR برای ژن های مورد نظر

بدین منظور مواد لازم با مقادیر مشخص شده در زیر برای هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت(مقادیری که در جدول زیر آمده است برای انجام یک واکنش PCR می‌باشد)(جدول ۱). در نهایت میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی جداول ۲ و۳ گذاشته شد. توالی ژن های سیدروفوری feoB و fyuA. در جدول۴ قابل مشاهده است. تهیه لام از بافت های سالم و سرطانی با استفاده از روش بافت شناسی و رنگ آمیزی ائوزین وهماتوکسیلین صورت گرفت.

نتایج

در این تحقیق از ۷۰ بیمار مبتلا به سرطان روده بزرگ و فرد سالم مراجعه کننده به کلینیک گوارش بیمارستان بقیه الله(عج) و تومور بانک ایران، بیوبسی تهیه شد. از این میان ۳۵ بیمار و ۳۵ فرد نرمال بود. این بیوبسی ها در محیط LB کشت داده شد و ۴۲ باکتری *E.coli* از آن ها جدا و برای ژن های سیدروفوری fyuA و feoB این باکتری ها پرایمر طراحی شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از این باکتری ها برای ژن feoB، ۵۹/۳٪(۱۶ نمونه از ۲۷ بیمار) بیماران کولورکتال مثبت و ۲۰٪(۳ نمونه از ۱۲ فرد) افراد سالم مثبت بودند. برای ژن fyuA نیز۱۴/۸٪(۴ نمونه از ۲۷ بیمار) بیماران کولورکتال مثبت و

۸(۱ نمونه از ۱۲ فرد) افراد سالم مثبت بودند(شکل ۱ و۲).

جدول ۱- مقادیر و مواد لازم در PCR ژن های feoB وfyuA

مواد	مقدار(میکرو لیتر)
Master mix, amplicon	۶
Primer Forward	۰/۵
Primer Reverse	۰/۵
DNA	۱
آب	۴
حجم نهایی	۱۲

جدول ۲-شرایط دمایی برای پرایمر ژن feoB

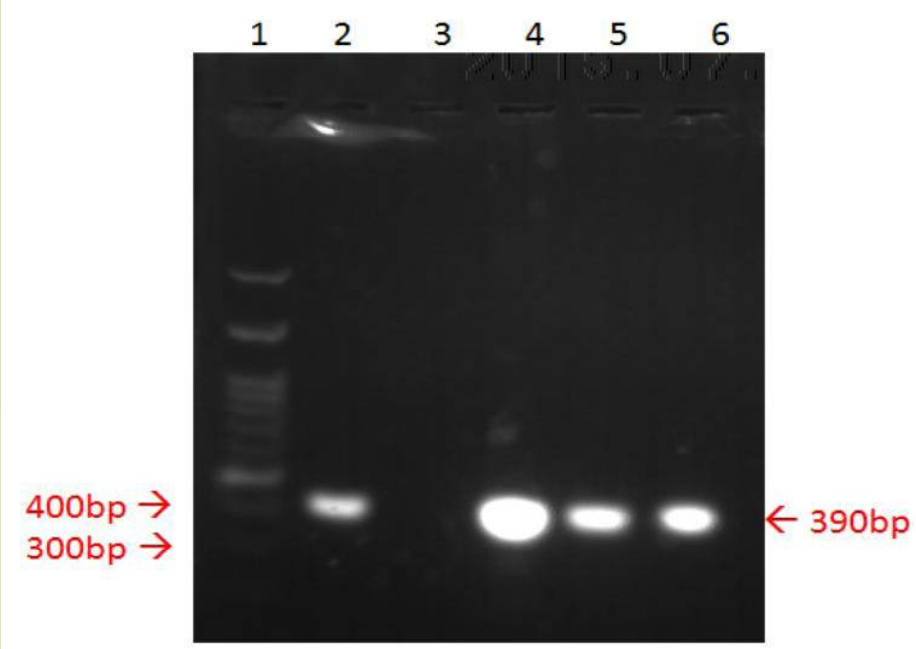
شرایط دمایی	دما درجه سانتی گراد	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون	۹۴	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۴	۴۵ ثانیه	۳۵
Annealing	۵۸	۴۰ ثانیه	
طویل سازی	۷۲	۴۵ ثانیه	
طویل سازی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۳-شرایط دمایی برای پرایمرژن FyuA

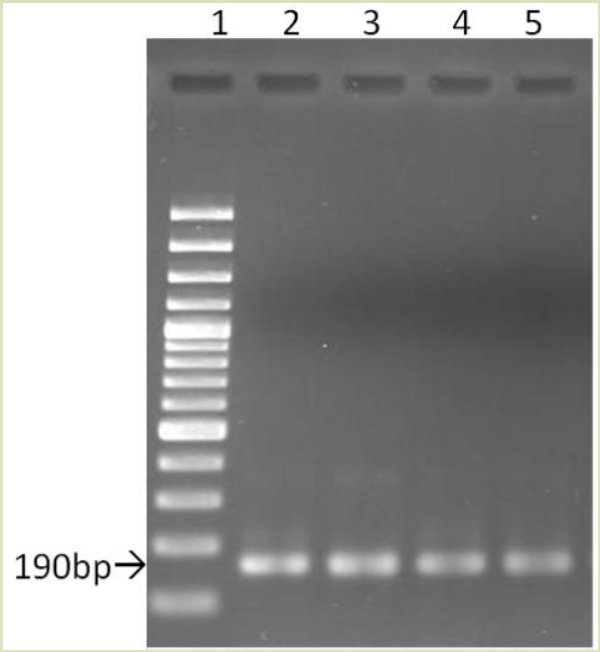
شرایط دمایی	دمادرجه سانتی گراد	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون	۹۴	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۴	۴۵ ثانیه	۳۵
Annealing	۶۲	۴۰ ثانیه	
طویل سازی	۷۲	۴۵ ثانیه	
طویل سازی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ٤- توالی ژن های سیدروفوری feoB و fyuA.

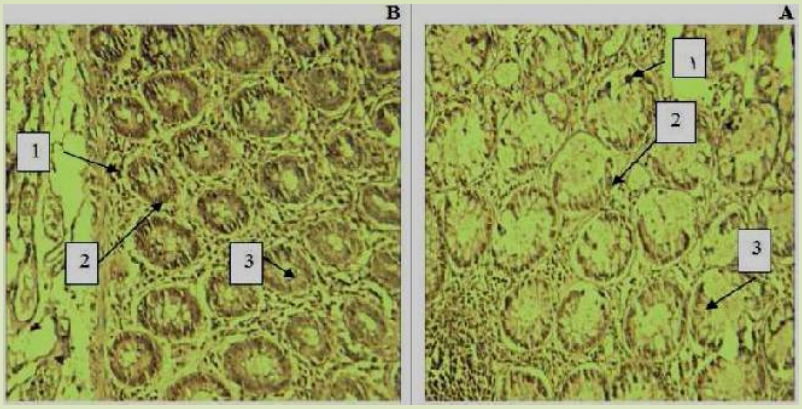
feoB_F	AAG TCA AAG CAG GGG TTG CGG G
feoB_R	GAC GCC GAC ATT AAG ACG CGC
fyuA_F	AGG GGG CAC AAC TGA TTC CGC
fyuA_R	TAC CGG GCC GTT TTC TGC CG



شکل۲- الگوی ژن feoB بر روی آگارز ۱٪. از چپ به راست به ترتیب:
چاهک شماره ۱: سایز مارکر فرمنتاز 100bp، چاهک شماره ۲: کنترل مثبت اهدایی از دانشگاه فرانسه، چاهک شماره ۳: کنترل منفی، چاهک شماره ٤ تا٦، برخی از نمونه هایی که برای ژن feoB مثبت بودند. اندازه قطعه تکثیر شده برای این ژن 390bp است.



شکل ۳- الگوی حاصل از قطعات تکثیر شده توسط پرایمر ژن fyuA با آزمایش PCR بر روی آگارز ۱/۵٪ .
به ترتیب از چپ به راست: لاین ۱: سایز مارکر 100bp از شرکت fermentase کانادا، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین های ۳ تا ۵: چند تا از نمونه ها که برای ژن fyuA مثبت بود. اندازه قطعه تکثیر شده برای این ژن، 190bp می باشد. یادآوری می گردد که کنترل مثبت در این آزمایش، اهدایی از محققین فرانسوی می باشد.



شکل ٤- A نمونه ای از بافت توموری کولون، B نمونه ای از بافت سالم
۱سلول هایی که هسته آن ها به شدت رنگ آمیزی شده، ۲ سلول هایی که هسته آن ها به میزان متوسط رنگ آمیزی شده، ۳ سلول هایی که هسته آن ها به طور ضعیف رنگ آمیزی شده

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۱ JAMES و همکارانش برروی توزیع تکامل نژادی باکتری *E.coli* خارج روده ای کار کردند که در این تحقیق برخی از مهم ترین ژن های ویرولانس این باکتری را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی روی سویه های *E.coli* گروه A_1,B_1,B_2,D مطالعاتی صورت گرفت که در آن صفات مربوط به هرکدام از موارد بیماریزایی از جمله این موارد تعیین برخی ژن های دخیل در تولید سیدروفور سویه های باکتری E.coli خارج روده ای می باشد(۹). در سال ۲۰۱۲ Agnieszka Kaczmarek و همکاران مطالعه ای را بر روی هموستازی آهن در باکتری ها انجام دادند.در این تحقیق که از باکتری k_{12} *E.coli* به عنوان نمونه استفاده شده بود با بررسی روش های جذب آهن در باکتری های گرم مثبت و منفی نماهای شماتیکی از آنها را برای مطالعه ترسیم کردند. ضمناً در این بررسی ژن های مرتبط با تولید سیدروفور در باکتری k^{12} -*E.coli* را مشخص کردند(۱۰). بر اساس اطلاعات موجود تا کنون مطالعه زیادی در خصوص بررسی ژن های سیدروفوری سویه-های باکتری E.coli ساکن در روده بزرگ بیماران مبتلا به سرطان کولورکتال در ایران انجام نشده است. با توجه به شیوع بیماری التهابی روده(IBD) و سرطان کولورکتال(CRC) مطالعات زیادی در زمینه جداسازی و شناسایی ژنوم باکتری های جدا شده از تومور های سرطانی انجام شده و اغلب دارای محدوده ژنومی PKS می باشند(۱۲). در مورد ژن های دخیل در تولید سیدروفور و هم چنین کپسول سویه‌های باکتری *E.coli* خارج روده تحقیقی انجام نشده است و در این پروژه fi بررسی دو ژن دخیل در تولید سیدروفور پرداخته شده است.

۱.ژن feoB برای بیوسنتز انتروباکتین رمز می شود .

۲.ژن های fyuA برای انتقال آهن –انتروباکتین به داخل سلول به کار می روند.

در شرایط کمبود فلز آهن باکتری *E.coli* ۱۰-۱۵ میلی گرم در لیتر انتروباکتین تولید می کند و با توجه به میل بالای اتصال انتروباکتین به Fe^{3+}، آهن محیط را به دست می آورد(۴).

منابع

1.Andrew, D., Ferguson, E., Hofmann, J.W. (1998). Coulton, kay diederichs, wolfram welte, siderophore-mediated iron transport: crystal structure of fhua with bound lipopolysaccharide. First Publish in: Science, 282(5397);2215-2220.

2.Bylarry, L. (2005). Barton - structural and functional relationships in prokaryotes: 1st (first) Edition Hardcover, December 28.

3.Cartron, ML., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, CJ., Andrews, SC. (2006). Feo--transport of ferrous iron into bacteria. Biometals, 19(2); 143-57.

4.Carolyn, A. (2013). Prodrug resistance mechanism is involved in colibactin biosynthesis and cytotoxicity. Journal of American Chemical Society, 135 (9); 3359–3362.

5.Cheryl, K. Y. Lau, H. I., Zhihong, L., Hans J. V. (2013). Structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. Journal of Bacteriology Am Soc Microbiol,54(65);123-128.

6.Cuevas-Ramos, G., Petit, CR., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(25); 11537-542.

7.Janelle, C. A., Ernesto, P. Ch., Mühlbauer, M., Tomkovich, S. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. Science, 338 (6103); 120-123.

8.Johnson, J. R., Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* . The other bad *E.* coli . Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 139(3); 155–162.

9.Johnson, J. R., Delavari, P. (2001). Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. Journal of Infectious Diseases, 183; 78-88.

10. Kaczmarek, A., Budzy ska, A., Gospodarek, E. (2012). Prevalence of genes encoding virulence factors among *Escherichia coli* with K1 antigen and non-K1 *E. coli* strains. Journal Of Medical Microbiology, 61;1360-1365.

11. Maelle, P., Friswell1, M. K., Alswied, Ab., Roberts, C. L., Song1, F., Flanagan, P. K. (2013). Colonic mucosa-associated diffusely adherentafaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. Gut microbiota, 48(8);53-58.

12. Moradi, A1., Khayamzadeh, M., Guya, M., Mirzaei, HR., Salmanian, R., Rakhsha, A. (2009). Survival of colorectal cancer in Iran. Asian Pac J Cancer Prev, 10(4); 583-6.