خوشه بندی بیانی پروتئین های سرطان دهانه رحم

حکیمه زالی[1]، هانیه فخار[1]، مصطفی رضایی طاویرانی[1*]، اکبر اکبری[2]

1) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

2) گروه ایمونولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ دریافت: 91/8/13 تاریخ پذیرش: 91/11/18

چکیده

مقدمه: سرطان دهانه رحم، دومین سرطان مرگ بار بین زنان در کشورهای در حال توسعه و هفتمین در کشورهای پیشرفته است. غربالگری در سرطان گردن رحم برای پیدا کردن ژن ها و پروتئین هایی که نقش بیومارکر تشخیصی و درمانی بازی کند در حال پیشرفت است از طرفی مکانیسم ملکولی تومورزایی وابسته به دسته های پروتئینی است که در حالت بیماری تغییر می نماید بنا بر این کشف این گروه های پروتئینی امری ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه به بررسی پروتئوم سلول های بافت سرطان سرویکس و مقایسه آن با بافت نرمال با کمک تکنیک پروتئومیک پـــرداخته می شود و پروتئوم از نظر آماری به دسته های پروتئینی مجزایی خوشه بندی می گردد.

مواد و روش ها: استخراج پروتئـــین از نمونه های بافت نرمال و سرطانی گردن رحم صورت گرفت سپس پروتئین ها در مرحله اول(IEF) بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند و مرحله دوم الکتروفورز دوبعدی SDS page است که مرحله جداسازی پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی می باشد. ژل های هر دو گروه مورد آزمایش، جهت رویت لکه های پروتئینی به روش کوماسی بلو آمیزی شدند. در نهایت پروتئین های دو گروه جهت آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری(آنالیز خوشه بندی و آنالیز مولفه اصلی) با نرم افزار progenesis same spot مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: آنالیز بیوانفورتیکی و آماری با نرم افزار progenesis same spot بر ژل های به دست آمده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی 158 نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان و تعدادی دارای کاهش بیان بودند. 19پروتئین در گروه سالم دارای بیان بیشتری نسبت به سرطانی داشتند در حالی که در گروه سرطانی 18 پروتئین دارای بیان بالاتر نسبت به نرمال داشتند. آنالیز خوشه بندی، پروتئین ها را از نظر بیان به 2 خوشه اصلی تقسیم نمود که بیانگر وجود پروتئین هایی با بیان مشابه در هر خوشه است که این پروتئین ها می توانند عملکرد مشابهی را در شرایط آزمایش ارائه نمایند یا بیانگر حضور همه آن ها در مسیر بیولوژیکی مشترک است. آنالیز PCA نتایج حاصل از خوشه بندی را تایید نمود و نشان داد که داده های پروتئینی بر طبق شرایط آزمایش خوشه بندی شده اند.

بحث و نتیجه گیری: در نهایت می توان گفت که آنالیزهای آماری چند متغیره ای نظیر کلاسترینگ یا آنالیز همبستگی و آنالیز مولفه اصلی کمک می کند به شناسایی ژن ها و گروه هایی از ژن ها که باعث تبدیل بافت نرمال به یک مرحله بدخیمی می شود. برای شناسایی دسته های پروتئینی دخیل در مکانیسم ملکولی سرطان سرویکس نیاز به مشخص شدن نوع پروتئین ها است که باید توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری جرمی تعیین هویت شوند.

واژه های کلیدی: سرطان دهانه رحم، پروتئوم، خوشه بندی، آنالیز مولفه اصلی

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

Email: rezaei.tavirani@ibb.ut.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

مقدمه

سرطان گردن رحم یا سرطان دهانه رحم (سرویکس) نوعی بیماری است که در آن رشد بافت سرطانی بدخیم از ناحیه گردن رحم نشأت می‌گیرد و به طور نامنظم و فزاینده ای تکثیر و منجر به تراریختگی آن می‌شود،(1). سرطان گردن رحم دومین سرطان رایج در زنان است. هر سال حدود 500 هزار زن به این بیماری مبتلا می‌شوند و حدود 300 هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند که بیشتر آن ها در کشورهای در حال توسعه هستند،(2). علت بیماری ناشناخته است ولی دانشمندان احتمال می‌دهند که با عفونت های ویروسی ارتباط داشته باشد که از آن جمله ویروس پاپیلومای انسانی(زگیل ناحیه تناسلی) را می‌توان نام برد. هنگامی که این ویروس برای چند سال در بدن باقی می‌ماند، به تدریج برخی از سلول ها را در گردن رحم به سلول های سرطانی بدل می‌کند و این سلول ها به طور پیشرونده مهاجم تر می شوند،(۳،۴). ضعف سیستم ایمنی به ویژه به صورت اکتسابی بیماری ایدز و مصرف داروهای سرکوب ایمنی عاملی مستعد کننده در ابتلا به سرطان دهانه رحم است،(5). جراحی، پرتو درمانی به صورت داخلی و خارجی و شیمی درمانی از روش های درمان این سرطان می‌باشد.(۶،۷)

غربالگری در سرطان گردن رحم برای پیدا کردن ژن ها و پروتئین ها، که ممکن است به عنوان مارکرهای بیولوژیکی کار کنند در حال پیشرفت است و نقش مهمی در شناسایی مکانیسم ملکولی تومور نیز بازی می کند،(8). در سال های اخیر تکنولوژی مربوط به توصیف لکه های پروتئینی نمایان شده بر ژل های الکتروفورز دو بعدی، توسعه قابل ملاحظه ای یافته و بانک های اطلاعاتی متعددی نیز در این زمینه ایجاد و گسترش یافته است که تأثیر این ابتکارات بر ارتقاء پروتئومیک بسیار چشمگیر است. تشخیص زود هنگام بیماری ها، یکی از آروزهای دیرینه بخش بالینی است که فناوری پروتئومیکی با فراهم آوردن این امکان، نوید بخش درمان سریع و مؤثر بیماری های مهلک می باشد. استفاده از بیوانفورماتیک و بانک های اطلاعاتی به منظور تفسیر یافته های پروتئومیکی و نیز فراهم آوردن امکان استفاده از دستاوردهای این فناوری به طور شگرفی در حال توسعه می باشد،(13-9). آنالیز آماری داده های عظیم پروتئومیکی با دارا بودن متغیرهای زیاد نیاز به روش های چند متغیره است که امکان آنالیز آماری هم زمان چندین متغیر را فراهم می کنند. در این مطالعه با کمک روش های آماری به بررسی و مقایسه پروتئوم بافت سالم و سرطان سرویکس پرداخته می شود تا با آنالیز چند گانه پروتئین ها بتوان الگوهای پروتئینی که منجر به تمایز بین بافت سرطانی و غیر سرطانی می شود را پایگذاری نمود.

مواد و روش ها

نمونه گیری

بافت سالم و سرطان سرویکس از 3 زن دارای ضایعات تناسلی مشکوک به سرطان گردن رحم انجام گرفت. ابتلا به سرطان سرویکس توسط متخصص پاتولوژی و متخصص زنان تایید گردید. نمونه ها به تانک های نیتروژن مایع انتقال داده شد.

استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از نمونه بافت سالم و سرطانی صورت گرفت. آن ها را دوبار با PBS شستشو داده شد سپس تحت شرایط نیتروژن مایع، کاملاً پودر شدند و به آن ها بافر سرد تریس 20 میلی مولار با pH=7/5 اضافه شد. این بافر حاوی 2 میلی مولار اتیلن دی آمین تترا استات 1، 1 میلی مولار فنیل متیل سول فونیل فلوراید 2، 0/32 مولار سوکروز به همراه مخلوطی از آنتی پروتئازها شامل(10 میلی مولار N - اتیل مالمید، 2 میلی مولار ایدواستات، 25 میلی مولار بنز آمیدین، 12/5 میلی مولار 6-آمینوکاپروئیک اسید) است. مخلوط هموژنیزه شده به مدت 30 دقیقه در دمای 10 درجه سانتی گراد در g 12000 سانتریفیوژ شد. مایع روئی حاصله جهت تعیین غلظت مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین های دو گروه آزمایشی به روش برادفورد،(14)، مورد سنجش قرار گرفت.

الکتروفورز دوبعدی

در بعد اول، IEF (Iso Electric Focusing)، از نوارهای ژلی IPG (Imobilized pH Gradiant) در رنج pH 3 تا 10 استفاده شد و پروتئین ها درون

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

دستگاه IPG بسته به pH ایزوالکتریک خود روی نوار استریپ تفکیک شدند.

بعد دوم شامل ژل پلی آکریل آمید با غلظت 12 درصد حاوی 15 میلی لیتر از محلول ذخیره 30 درصد (اکریل آمید به علاوه بیس آکریل آمید با نسبت 29/2 درصد به 0/8 درصد)، 18/76 میلی لیتر آب دی‌یونیزه و 11/25 میلی لیتر بافر تریس و همراه 30 میکرولیتر TEMED و 30 میکرولیتر آمونیم پرسولفات است. بافر الکتروفورز(Running buffer) به تانک های بالا و پائین افزوده می‌شود. این بافر شامل 0/025 مولار تریس-اسیدکلرئیدریک(یا باز)، 0/192 مولار گلایسین و 0/1 درصد SDS می‌باشد. در نهایت پس از برقراری جریان، الکتروفورز در جریان ثابت 30 الی 40 میلی آمپر برای هر پلیت و با استفاده از سیستم خنک شده در دمای 9 درجه سانتی گراد انجام گردید. رنگ آمیزی پروتئین ها به روش رنگ آمیزی کوماسی بلو انجام شد و ژل ها اسکن و تصاویر پردازش شد و در نهایت با روش های بیو انفورماتیکی و نرم افزار های آماری مورد آنالیز بیوانفورماتیکی و آماری قرار گرفت.(15)

آنالیز تصویر ژل‌های دوبعدی

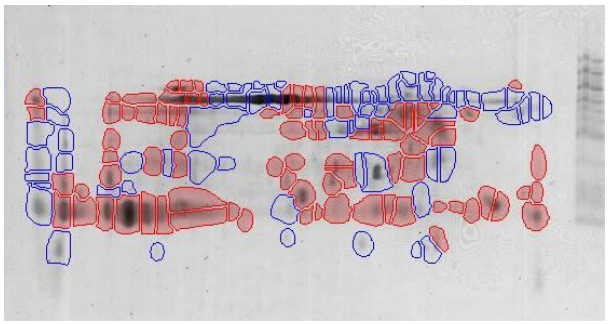
الکتروفورز دوبعدی قادر است صدها پلی پپتید را از یک محلول پروتیئنی بر اساس بار الکتریکی و وزن مولکولی آن ها جدا کند. پس از طی مراحل رنگ آمیزی، پروتئین ها به صورت لکه هایی با صفات و ویژگی های ظاهری متفاوت مانند شکل، اندازه و شدت رنگ نمایان می‌گردند. پس از اسکن ژل، استخراج داده های مربوط به نمونه بافت سالم و سرطانی با نرم افزار Non Progenesis Same Spot Linear مورد بررسی قرار گرفت. تعداد نقاط پروتئینی و تفاوت آن ها(افزایش و یا کاهش بیان) توسط این نرم افزار آنالیز شد و با آمار چند متغیره(خوشه بندی و آنالیز مولفه اصلی) پروتئین ها از نظر بیان خوشه بندی شدند.

یافته های پژوهش

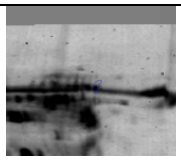
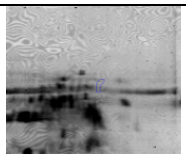
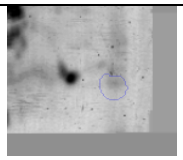
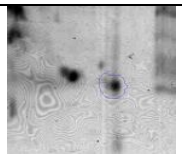
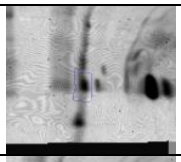
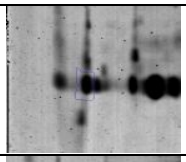
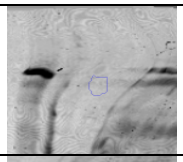
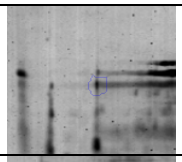
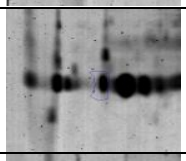
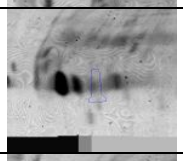
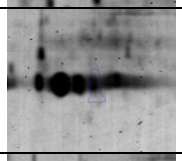
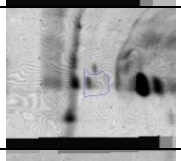
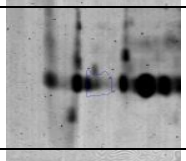
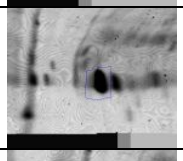
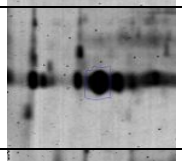
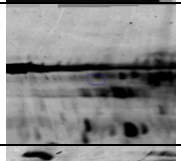
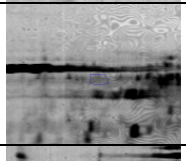
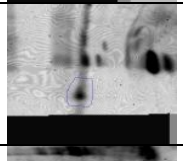
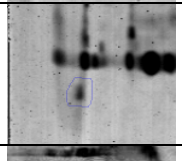
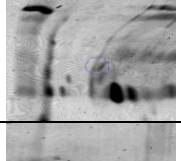
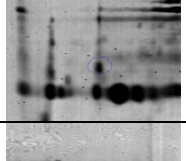
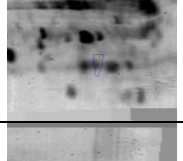
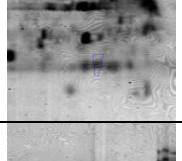
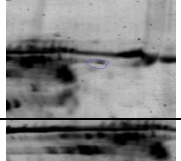
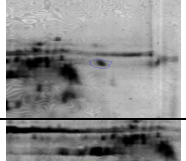
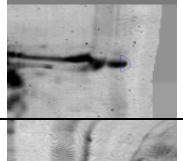
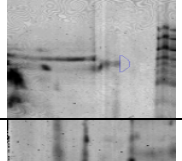
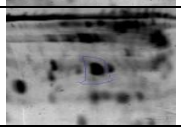
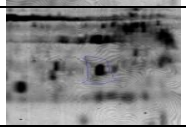
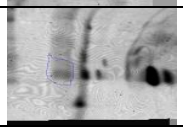
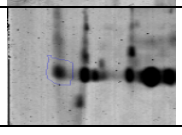
شناسایی مارکرهای تشخیصی و درمانی و کشف مکانیسم های بیماری زایی از روی بیومارکرهای پروتئینی واحد و کمپلکس های پروتئینی هدف تحقیقات پروتئومیکس است. در این مطالعه دو گروه آزمایشی شامل نمونه بافت سالم به عنوان کنترل و نمونه بافت سرطان سرویکس مورد آنالیز پروتئومیکی و بیوانفورماتیکی قرار گرفتند. آنالیز ژل ها با کمک نرم افزار progenesis same spot 158 نقطه پروتئینی را مشخص کرد که تعدادی از آن ها دارای افزایش بیان و تعدادی دارای کاهش بیان بودند. 19 پروتئین در گروه سالم دارای بیان بیشتری نسبت به سرطانی داشتند در حالی که در گروه سرطانی 18 پروتئین دارای بیان بالاتر نسبت به نرمال داشتند. در شکل شماره 1 تصویر آنالیز ژل الکتروفورز دوبعدی با نرم افزار progenesis same spot از ژل الکتروفورز دوبعدی گروه سرطانی را نشان می دهد. محدوده قرمز رنگ بیانگر پروتئین هایی است که در گروه سرطانی بیان بالاتر نسبت به نرمال دارند و محدوده آبی رنگ پروتئین هایی را نشان می دهد که در گروه نرمال بیان بالاتری نسبت به سرطانی دارند. مقایسه ژل های دو گروه در بسیاری از جایگاه دارای تفاوت بیان در نقاط است که در شکل شماره 2 تعدادی از آن ها انتخاب شده و به نمایش گذاشته شده است. تفاوت معنی داری بیانی($P<0.05$) در بین دو گروه با آنالیز آماری ANOVA تعیین گردید و میزان تغییر بیان برای هر نقطه در شکل، Fold>2 در نظر گرفته شده است. نرم افزار progenesis same spot خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی باشند؛ بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در سلول های مورد نظر دارند(با هم افزایش و یا کاهش می یابند) که نتایج حاصل از این آنالیز خوشه بندی، در شکل شماره 3 مشاهده می شود. پروتئین های بیان شده به دو خوشه اصلی دسته بندی شده اند. شکل شماره 3 الف خوشه بندی پروتئین هایی که در گروه کنترل دارای بیان بالاتری نسبت به گروه سرطانی بودند و شکل شماره 3 ب خوشه بندی پروتئین هایی که در گروه سرطانی دارای بیان بالاتر نسبت به نرمال بودند. شکل شماره 4 آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی را نشان می دهد که برای تایید آنالیز

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

خوشه بندی صورت می گیرد. شکل شماره 4 الف آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه کنـــترل و شکل شماره 4 ب آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین های گروه سرطانی را نشان می دهند.

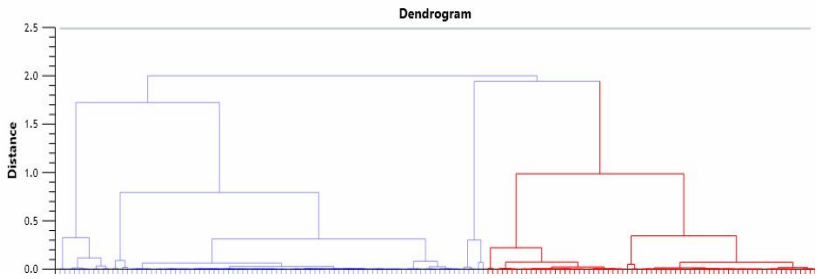


شکل شماره 1. آنالیز ژل الکتروفورز دوبعدی با نرم افزار progenesis same spot **از ژل الکتروفورز دوبعدی گروه سرطانی**
محدوده قرمز رنگ بیانگر پروتئین هایی است که در گروه سرطانی بیان بالاتر نسبت به نرمال دارند.
محدوده آبی رنگ پروتئین هایی را نشان می دهد که در گروه نرمال بیان بالاتری نسبت به سرطانی دارند.

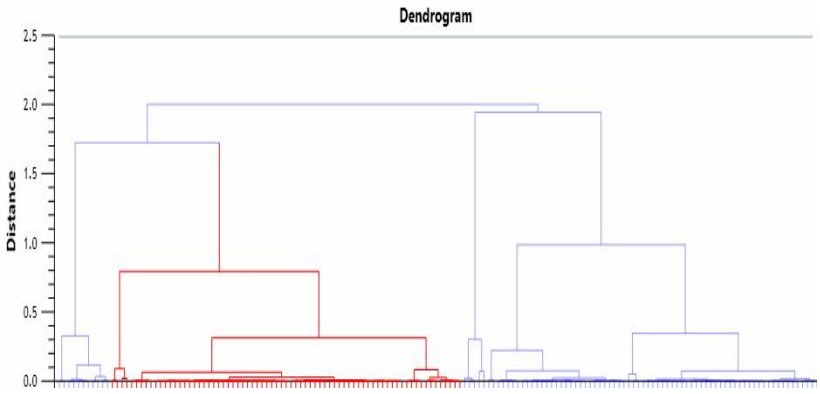
شماره نقاط	سالم	بیمار	شماره نقاط	سالم	بیمار
14			135		
127			61		
129			130		
128			134		
52			140		
100			120		
66			168		
98			115		

شکل شماره 2. جایگاه تعدادی از نقاط که دارای تفاوت معنی داری بیانی در بین دو گروه هستند

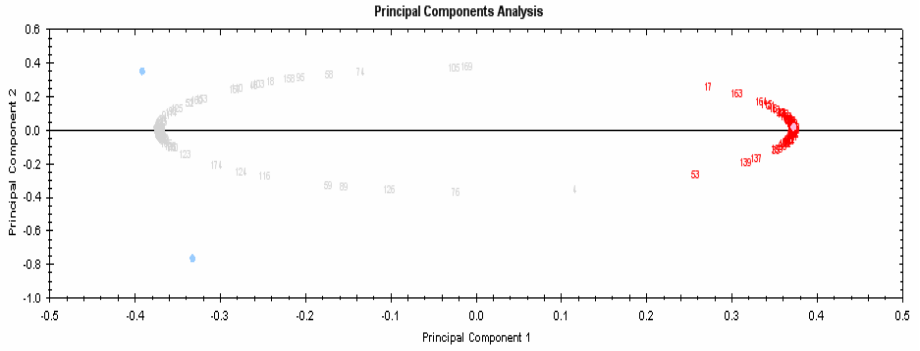
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]



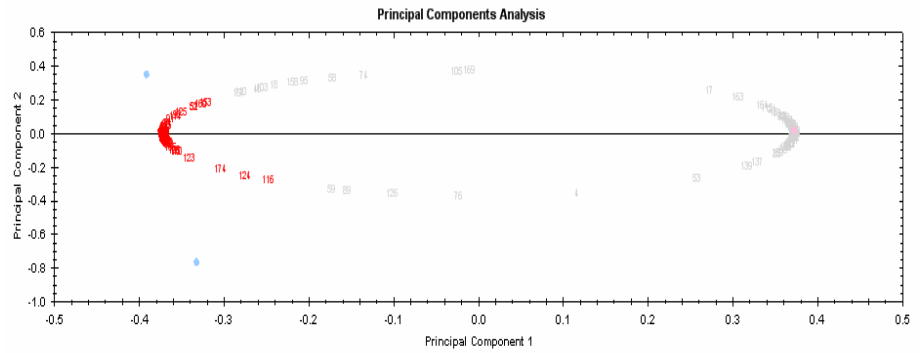
شکل شماره 3 الف. خوشه بندی پروتئین هایی(قرمز رنگ) که در گروه کنترل بیان بیشتری نسبت به سرطانی داشتند



شکل شماره 3 ب. خوشه بندی پروتئین هایی(قرمز رنگ) که در گروه سرطانی بیان بیشتری نسبت به کنترل داشتند



شکل شماره 4 الف. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین هایی که در گروه کنترل بیان بیشتری نسبت به سرطانی داشتند اعداد قرمز رنگ بیانگر نقاط پروتئینی هستند که در گروه کنترل بیان شده اند



شکل شماره 4 ب. آنالیز مولفه اصلی برای پروتئین هایی که در گروه سرطانی بیان بیشتری نسبت به کنترل داشتند اعداد قرمز رنگ بیانگر نقاط پروتئینی هستند که در گروه سرطانی بیان شده اند

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

بحث و نتیجه گیری

سرطان دهانه رحم، دومین سرطان مرگبار بین زنان در کشور های در حال توسعه و هفتمین در کشورهای پیشرفته است،(16)، که امروزه مشخص شده، عامل اصلی ابتلا به آن ویروس پاپیلومای انسانی(HPV) است که بیش از 100 نوع از آن وجود دارد و 15 نوع آن موجب بروز سرطان دهانه رحم می‌شود. این ویروس، عامل اصلی ابتلا به سرطان دهانه رحم است،(17). دو ژن ویروسی، E6 و E7، همواره در سلول های سرطان دهانه رحم HPV مثبت بیان می شود. محصولات ژنی آن ها باعث غیر فعال کردن ژن مهارکننده تومور P53 و پروتئین رتینوبلاستوما(pRB)، می شوند. علاوه بر این، E6 باعث فعال شدن آنزیم تلومراز شده و E6 و E7 با هم منجر به نامیرایی سلول های اپی تلیال می شوند،(3). در این تحقیق به مقایسه پروتئوم دو بافت نرمال و سرطان سرویکس به منظور یافتن اختلاف دو بافت در سطح پروتئوم و دسته بندی این تفاوت ها از طریق آنالیزهای پروتئومیکی و بیوانفورماتیکی پرداخته شده است. تغییرات بیان در سطح پروتئوم با کمک تکنیک ژل الکتروفورز دوبعدی مورد آنالیز پروتئومیکی قرار گرفت. امروزه استفاده از نرم افزار های آنالیز ژل کمک بیوانفورماتیک را در ساده نمودن آنالیز داده های پروتئومیکی امری اجتناب ناپذیر نموده است. پیشرفت هایی که در سطح نرم افزاری صورت گرفته است آنالیز های آماری چند متغیره را در داده های چند بعدی پروتئومیکی تسهیل نموده است. در این مطالعه ژل های الکتروفورز دوبعدی با استفاده از نرم افزار progenesis same spot مورد آنالیز قرار گرفتند که شکل شماره 1 از نظر ظاهری پروتئین ها را به دو گروه دسته بندی نموده است. دسته ای که در گروه سالم دارای بیان بالاتری نسبت به سرطانی بودند و دسته دوم در گروه سرطانی دارای بیان بالاتری نسبت به نرمال بودند. تعدادی از تفاوت های بیانی بین نقاط در سطح ژل ها با مقایسه دو گروه، در شکل شماره 2 نشان داده شده است. نتایج آنالیز پروتئوم نشان داد که 158 نقطه پروتئینی در دو گروه آشکار شده است که مقایسه بین کنترل و سرطانی در سطح بیان پروتئینی حکایت از بیان بالاتر 19پروتئین در گروه سالم و 18 پروتئین در گروه سرطانی است. در مطالعه ای که توسط Su Mi Bae و همکارانش در سال 2005 بر روی سرطان سرویکس انجام شده در مجموع 35 پروتئین تشخیص داده شد که 17 پروتئین افزایش بیان و 18 پروتئین کاهش بیان داشتند،(18). Xueqiong Zhu و همکارانش نیز با مقایسه الگوهای پروتئین در سرطان سنگفرشی دهانه رحم با بافت نرمال گردن رحم نشان دادند که 55 لکه پروتئینی به طور قابل توجهی تغییر کرده است، که 24 لکه های پروتئینی به طور موزون افزایش یافته و 31 لکه پروتئین با شدت کاهش یافته است،(19). تفاوت معنی دار بیان ژن در بین دو یا تعداد بیشتری از شرایط جهت شناسایی ژن هایی که دارای بیان بالایی در یک حالت بیماری خاص(در مقابل نرمال و شرایط غیر بیماری) هستند، استفاده می شود. ارتباطات بر پایه سطوح بیان هم زمان باعث تسخیر تمایل کلی برای یک جفت یا گروهی از ژن ها که دارای سطوح بیان مشابه در آن شرایط هستند ایجاد می کند(سطح بیان بالا در یک مجموعه از شرایط و پایین در گروهی دیگر) و می تواند به طور واضح مکانیسم غالب را از این طریق شناسایی نمود.(21-20)

نرم افزار progenesis same spot با استفاده از روش آنالیز همبستگی، خوشه بندی پروتئین ها بر اساس میزان بیان آن ها را مورد آنالیز قرار می دهد، به طوری که پروتئین هایی که در یک خوشه دسته بندی می شوند، دارای بیان مشابهی می باشند، بدین معنی که تغییر بیان یکسانی را در حالت سلولی مورد نظر دارند(با هم افزایش و یا کاهش می یابند). در شکل شماره 3 الف و ب آنالیز خوشه بندی، پروتئین ها را از نظر بیان به دو خوشه اصلی تقسیم نموده است. خوشه بندی پروتئین هایی که در گروه کنترل بیان بیشتری نسبت به سرطانی داشتند با رنگ قرمز در شکل شماره 3 الف نشان داده شده و در شکل شماره 3 ب نیز خوشه های قرمز رنگ که بیانگر بیان پروتئینی هایی است که در بافت سرطانی بیان بالاتری نسبت به نرمال داشتند. ابزار های بسیاری برای تحلیل مجموعه های پروتئین ها وجود دارند، اما اغلب آن ها

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

نتایج حاصله را در یک تصویر ساده و شفاف و قابل تفسیر ارائه نمی دهند. هدف از خوشه بندی در این تحقیق بررسی خوشه بندی بر اساس میزان بیان بود. خوشه بـــندی بر اســـــاس بیان، نشان دهنده وجود پروتئین هایی است که می توانند وابستگی بیولوژیک نسبت به هم داشته باشند. مطالعات پیشین نیز که با کمک این نـــرم افـــزار به آنالـــیز ژل های دوبعدی پرداخته اند نیز نتایج مشابهی را نشان می دهند و بیان می کنند که پروفایل بیانی مشابه اعضای یک خوشه دارای تفسیر بیولوژیکی منطقی است.(22-23)

مطالعات متعددی به جستجو و مطالعه فرایندهای سلولی در سطح دسته های ژنی بر خلاف مطالعه تک ژنی پرداخـــتند. امروزه، هدف از یک آزمایش تعیین گروه هایی از ژن ها با سطوح بیان مشابه تحت شرایط است. گروه های ژنی شناخته شده بر برنامه های تنظیمی متمایزی دلالت می کنند و اغلب به خوبی مسیرها و کمپلـــس های پروتئیـــنی را نشـــان می دهند،(24-25). یک طیف وسیعی از روش ها برای شناسایی دسته های ژنی با استفاده از داده های ژنومی و پروتئومی به کار گـــرفته شده است. از جمله این روش ها شناسایی دسته های ژنی با روش خوشه بندی بردار ژنی است. یکی از روش های خوشه بندی بردار ژنی، خوشه بندی سلسله مراتبی است. در این نوع خوشه بندی، ارتباط بین ژن ها به وسیله یک درخت نشان داده می شود که طول شاخه ها انعکاسی از درجه شباهت بین بردارهای ژنی است که به وسیله روش نمره دهی مانند ضریب همبستگی پیرسون به دست می آید. روش های عمومی دیگر خوشه بندی شامل خوشه بندی k-means است که یک روش تفکیک کننده جزیی است. روش هـــایی که ژن ها را به خوشه هایی از یک زیرمجموعه از شرایـــط شناسایی می کند به روش های دو کلاسترینگ(biclustering) یا کلاستـــــرینگ دو طـــرفه معروف است. چنین روش هایی در به دام اندازی ژن هایی که تحت یک شرایط خاص هم بیان هستند موثر است و هم چنین قادر به شناسایی ژن هایی که در چند مسیر حضور دارند نیز هستند،(27-28). روش های خوشه بندی بردار ژنی گفته شده به عنوان روش های بدون ناظر دسته بندی می شوند. روش های تحت نظارت یک کلاس جدا هستند که اطلاعات بیولوژی قبلی مانند انواع اینترکشن ها و مسیرهای بیولوژیک شناخته شده در آن شرکت دارند. این روش ها یک راه مفید در ترکیب داده های بیان ژنی با دیگر اطلاعات هستند، اما آن ها هم چنین می توانند باعث محـــدود شدن کشف های جدید با تمرکز بر روی ارتباطات بیولوژیکی پایه گذاری شده موجود شوند. بیشتر این که روش های تحت نظارت به طـــور بالایی وابســـته به کیفیت داده هایی هستند که آموزش دیده اند. با این حال روش های کلاسترنیگ تحت نظارت ثابت شده که برای کشف ارتباطات جدید بین ژن ها و فرایندهای بیولوژیک شناخته شده مفید هستند.

نرم افزار progenesis same spot آنالیز آماری چند متغیره دیگری به نام آنالیز مولفه اصلی(PCA) برای تایید آنالیز خوشه بندی انجام می دهد که شکل شماره 3 الف و ب این آنالیز را بر روی پروتئوم دو گروه آزمایشی نشان می دهد. آنالیز مولفه اصلی جهت تولید ساده ترین نمایش گرافیکی از داده های چند بعدی است. در هر دو شکل جایگاه پروتئین های هر دو گروه را نشان می دهد و بیانگر این است پروتئین هایی که متمایل به یک سمت هستند خوشه های مشترک زیادی با هم دارند. از طرفی PCA بیانگر این است که هیچ outlier در داده ها وجود ندارد و داده ها بر طبق شرایط آزمایش خوشه‌بندی شده اند. PCA کاربردهای زیادی در داده های چند بعدی پروتئومیکی دارد. نتایج آنالیز PCA پراکندگی اعضا هر خوشه در اطراف یک بردار را نشان می دهد و بیانگر این است که نقاط نزدیک به یکدیگر متعلق به یک کلاس هستند که در پروتئومیکس تنوع را در بین مجموعه داده می تواند دسته بندی کند و اعضاء هر دسته را نیز مشخص نماید. از طرفی اگر گونه های متفاوتی از داده مورد استفاده قرار گیرد می تواند خوشه های هر گونه را نیز مشخص نماید و نشان دهد که همه نمونه های یک گونه در اطـراف یـــک بردار واضـــح قـــرار می گیـــرند و همه خوشـــه هـــا به هم نـــزدیک هستـــند،(۲۸،۲۹). Mullick, J.B. و همکارانش در سال 2010 در مطالعه ای با استفاده از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

PCA و تکنیک های خوشه بندی فازی به طبقه بندی پروفایل پروتئین بافت های مختلف تخمدان، دهانه رحم، سرطان دهان پرداختند و اعلام نمودند که امیدوارند با اعتبار سنجی این روش ها بتوان برای تشخیص زود هنگام سرطان های مختلف در تمام شرایط با حساسیت و اختصاصیت بالا استفاده نمود،(30). در مطالعه دیگری PCA پروفایل پروتئینی نمونه های بافتی سرویکس نشان داد که یک روش بسیار خوب تشخیصی محسوب می گردد به طوری که اختصاصیت و حساسیت بسیار بالا، نزدیک به 100 درصد را نشان می دهد.(31)

سرطان یک بیماری است که تنظیم سلولی در آن به هم خورده و از دست رفته است و بسیاری از محققین تلاش دارند تا کمک کـــنند به حـــل مکانیسم های پیچیده ای که در انتقال از حالت های سرطانی به نرمال وجود دارد،(34-32). بیشتر مطالعات بر روی شناسایی ژن هـــایی با بـــیان متفاوت مانند ژن هایی که دارای بیان بالایی در حالت های توموری در مقایسه با بافت نرمال هستند صورت می پذیرد. یک رویکرد جایگزین شناسایی ژن هایی است که به طـــور متفاوتی هم بیان هستند(مانند یک گروه از ژن ها که با هم در بافت نرمال بیان می شوند اما در بافت توموری نیستند) که ممکن است نمایانگر برنامه تنظیمی باشد که در سرطان تخریب شده یا متوقف شده است. کارهای اخیر بر روی شناسایی مسیرهایی تمرکز کرده اند که الگوهای بیان سرطانی ناسازگاری را نشان می دهند. آنالیزهای آماری چند متغیره ای نظیر کلاسترینگ یا آنالیز همبستگی و آنالیز مولفه اصلی کمک می کند به شناسایی ژن ها و گروه هـــایی از ژن ها که باعث تبدیل بافت نرمال به یک مرحله بدخیمی می شود. برای شناسایی دسته های پروتئینی دخیل در مکانیسم ملکولی سرطان سرویکس نیاز به مشخص شدن نوع پروتئین ها است که باید توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری جرمی تعیین هویت شوند.

سپاسگزاری

این مطالعه برگرفته از پـــایـــان نامـــه دانشجوی کارشناسی ارشد هانیه فخار است. از مرکز تحقیقات پروتئومیکس دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشـــتی که در اجرای پـــروژه همکـــاری داشـــتند تشـــکر می گردد.

References

1-Bae SM, Lee CH, Cho YL, Nam KH, Kim YW, Kim CK, et al. Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. Gynecol Oncol 2005;99:26-35.

2-Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.

3-Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. Rev Med Virol 2009;19:97-113.

4-Das Ghosh D, Bhattacharjee B, Sen S, Premi L, Mukhopadhyay I, Chowdhury RR, et al. Some novel insights on HPV16 related cervical cancer pathogenesis based on analyses of LCR methylation, viral load, E7 and E2/E4 expressions. PLoS One 2012; 7:e44678.

5-Chirenje ZM. HIV and cancer of the cervix. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2005;19:269-76.

6-Liu H, Han Y, Mi R, Zhang Y, Su G, Wang H, et al. Identification of cervical cancer proteins associated with treatment with paclitaxel and cisplatin in patients. Int J Gynecol Cancer 2011;21:1452-7.

7-Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, et al. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. Lancet 1997;350:535-40.

8-Van Gorp T, Cadron I, Vergote I. The utility of proteomics in gynecologic cancers. Curr Opin Obstet Gynecol 2011;23:3-7.

9-Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. Proteomic applications for the early detection of cancer. Nat Rev Cancer 2003;3:267-75.

10-Kolch W, Mischak H, Pitt AR. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research, Clinical Science 2005; 108:369-83.

11-Patterson SD and Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. Nature Genet 2003;33:311-23.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

12-Reif DM, White BC and Moore JH. Integrated analysis of genetic, genomi and proteomic data. Expert Rev Proteomics 2004;1:67-75.
13-Agaton C, Uhlén M, Hober S. Genome-based proteomics. Electrophoresis 2004:25: 1280-8.
14-Zali H, Ahmadi G, Bakhshandeh R, Rezaei-Tavirani M. Proteomic analysis of gene expression during human esophagus cancer. J Paramed Sci 2011;2:37-44.
15-Moravej Farshi H, Zali H, Rezaei-Tavirani M, Toossi P. Proteomic analysis of gene expression in basal cell carcinoma. Iran J Dermatol 2010;13:112-7.
16-Arbyn M, Raifu AO, Weiderpass E, Bray F, Anttila A. Trends of cervical cancer mortality in the member states of the European Union. Eur J Cancer 2009;45: 2640-8.
17-Magnusson PK, Sparén P, Gyllensten UB. Genetic link to cervical tumours. Nature 1999;400:29-30.
18-Bae SM, Lee CH, Cho YL, Nam KH, Kim YW, Kim CK, et al. Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients. Gynecol Oncol 2005;99:26-35.
19 Zhu X, Lv J, Yu L, Zhu X, Wu J, Zou S, et al. Proteomic identification of differenttially-expressed proteins in squamous cervical cancer. Gynecol Oncol 2009;112: 248-56.
20-Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:15545-50.
21-Gusnanto A, Calza S, Pawitan Y. Identification of differentially expressed genes and false discovery rate in microarray studies. Curr Opin Lipidol 2007;18:187-93.
22-Nordon IM, Brar R, Hinchliffe RJ, Cockerill G, Thompson MM. Proteomics and pitfalls in the search for potential biomarkers of abdominal aortic aneurysms. Vascular 2010;18:264-8.
23-Zali H, Rezaei Tavirani M, Pakzad I. [Proteomic study of rat hippocampus in treatment of Lavandula Aqua extract]. J Ilam Uni Med Sci 2013:20:9-16.(Persian)
24-Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, Marzioch M, et al. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. Nature 2006;440:631-6.
25-Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray, AW. From molecular to modular cell biology. Nature 1999;402:C47-C52.
26-Haeseleer DP. How does gene expresion clustering work? Nat Biotechnol 2005; 23:1499-501.
27-Kaufman L. Russeeuw P. Finding grops in data: An introduction to cluster analsis; John Wiley & Sons, Inc:New York. 1990.
28-Lancashire L, Schmid O, Shah H, Ball G. Classification of bacterial species from prteomic data using combinatorial apprraches incorporating artificial neural netwoks, cluster analysis and principal componnts analysis. Bioinformatics 2005;21:2191-9.
29-Marengo E, Leardi R, Robotti E, Righti PG, Antonucci F, Cecconi D. Applicction of three-way principal component analsis to the evaluation of two-dimensional maps in proteomics. J Proteome Res 2003; 2:351-60.
30-Karemore G, Mullick JB, Sujatha R, Nielsen M, Santhosh C. Classification of protein profiles using fuzzy clustering techniques: An application in early diagnosis of oral, cervical and ovarian cancer. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2010;2010: 6361-4.
31-Bhat S, Patil A, Rai L, Kartha VB, Santhosh C. Protein profile analysis of cellular samples from the cervix for the objective diagnosis of cervical cancer using HPLC-LIF. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010;878:3225-30.
32-Macgregor PF. Gene expression in cancer: the application of microarrays. Expert Rev Mol Diagn 2003;3:185-200.
33-Nielsen TO. Microarray analysis of sarcomas. Adv Anat Pathol 2006;13:166-73.
34-Segal E, Friedman N, Kaminski N, Regev A, Koller D. From signatures to models: understanding cancer using microbarrays. Nat Genet 2005;37:S38-45.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]

Proteomic Study of Cervical Cancer

Zali H[1], Fakhar H[1], Rezaei Tavirani M[1],Akbari A[2]*

(Received: 3 Nov. 2012 Accepted: 6 Feb. 2013)

Abstract

Introduction: Cervical cancer is the second fatal cancer among women in developing countries and seventh in developed countries. Screening cervical cancer to find genes and proteins that play a role in the developpment of diagnostic and therapeutic biomarker, in the other hand, molecular mechanism of tumor genesis is also associated to the protein cluster that will change in disease, so discovery of protein clusters appear to be necessary. In this study, for better resolution proteome of cervical cancer tissues is analyzed by proteomic techniques.

Materials & Methods: Proteins extracted from the normal and cervical cancer tissues, then protein separated in first (IEF) depending on their isoelectric pH on strip. Second dimensional SDS page electrophoresis to separate proteins by molecular weight was performed. For detecting protein spots, both gels were silver stained. Finally for bioinformatics and statistical analysis (clustering analysis and principal component analysis) of proteins in the two groups was studied with the progenesis same spot software.

Findings: Bioinformatics and statistical analysis of two-dimensional gel electrophoresis techniques obtained 158 protein spots from both excremental groups. 19 protein spots were more expression in cancer than normal groups whereas 18 proteins in normal have more expression than cancer groups. Clustering analysis divided proteins into two main clusters that indicated there is an expressed protein is similar in each cluster which these proteins can provide similar performance in terms of testing or indicating its presence in the same biological pathway. PCA analysis confirmed the results of clustering and showed the protein has been classified in accordance with the test conditions.

Discussion & Conclusion: According to the results we concluded that multivariate statistical analyzes such as clustering, principal component analysis or correlation analysis helps to identify genes and groups of genes that transform normal tissue to a malignant stage. To identify the protein classes involved in molecular mechanisms of cervical cancer need to determine the type of protein that must be identified by mass spectrometry.

Keywords: cervical cancer, proteome, clustering, principal component analysis

1. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Ilam, Iran
**(correspondence author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-28]