

شناسایی و مقدار سنجی نسبی تغییرات پروتئوم مبتنی بر اشک متأثر از بیماری قوز قرنیه

سودابه شفیعی^۱، خسرو جدیدی^{۲*} و خسرو خواجه^{۱*}

^۱ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، گروه چشم پزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۲۲

چکیده

قوز قرنیه حالتی نامتقارن از نازک شدن پیشرونده قرنیه است که به طور معمول در اوایل نوجوانی بروز می‌کند و میزان تخمینی شیوع آن حدود ۱ نفر در هر ۲۰۰۰ نفر از جمعیت انسانی است. برای آشکارسازی تغییرات فراوانی پروتئینهای نمونه اشک میان دو گروه بیمار و شاهد، مقدارسنجی پپتیدهای حاصل از هضم پروتئولیتیکی پروتئینها، بدون نشاندار کردن آنها و با استفاده از استراتژی الکتروفورز ژلی یک بعدی و کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی متوالی، انجام شد. نتایج آنالیز آماری برای یافتن پروتئینهای با بیان متفاوت نشان داد که به ترتیب ۲۸ و ۱۴ پروتئین کاهش و افزایش سطح بیان داشتند. بر اساس نتایج حاصل از آنالیز هسته‌شناسی ژنی، فرآیندهای زیستی که عمدتاً در اثر تغییرات سطح بیان زیر مجموعه پروتئینی فوق‌الذکر در آسیب‌شناسی بیماری درگیر می‌شوند؛ شامل: فرآیندهای سلولی (۲۷/۱ درصد)، فرآیندهای متابولیسمی (۲۰/۲ درصد)، تنظیم زیستی (۱۱/۶ درصد)، سازماندهی اجزای سلولی (۹/۳ درصد) و پاسخ به محرک‌ها (۹/۳ درصد) می‌باشند. علاوه بر این، آنالیز هسته-شناسی ژنی مرتبط با جایگاه سلولی این پروتئینها حاکی از این است که گروه عمده‌ای از آنها به فضای درون سلولی تعلق دارند. این قبیل مطالعات پروتئومیک، می‌توانند به ارتقای دانش پایه ما در حوزه فرآیندهای زیستی کمک کرده و درکی عمیق‌تر از مکانیسمهای زمینه‌ساز بیماریها بدهند.

واژه‌های کلیدی: پروتئومیک، قوز قرنیه، کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی، هسته‌شناسی ژنی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۷۱۷، پست الکترونیکی: khajeh@modares.ac.ir

مقدمه

که تحلیل برنده قرنیه چشم است. در این بیماری، اختلال در ساختار یا ترکیب قرنیه منجر به تضعیف و نازک شدن آن می‌شود و در نهایت تحت تأثیر فشار داخلی چشم، قرنیه ضعیف شده تغییر انحنای داده، برآمده شده و به یک حالت مخروطی تبدیل می‌گردد (۳۳، ۴) و (۳۵). میزان شیوع این بیماری، در نقاط مختلف دنیا متغیر است. مطابق با گزارش ارائه شده توسط مؤسسه ملی چشم (National Eye Institute (NEI)، این اختلال شایع‌ترین علت زوال قرنیه در ایالات متحده بوده و علائم بیماری از میان هر ۲۰۰۰ نفر، حدوداً در یک نفر ظاهر می‌شود. اما در گزارشهای دیگر که میزان شیوع بالاتر بوده، در هر ۵۰۰ نفر،

ساختار قرنیه چشم عمدتاً شامل آب (۷۸ درصد)، ریزرشته‌های منظم کلاژن، پروتئوگلیکان‌ها و سلولهای کراتوسیت می‌باشد و از پنج لایه اپی‌تلیوم، بومن (Bowman's layer)، استروما (۹۰ درصد)، غشای دسمه (Descemet's membrane) و اندوتلیوم تشکیل شده است (۴). تاکنون چندین نوع از اختلالات مرتبط با قرنیه مانند خراشیدگی، زوال، زخم، نورگزایی، کراتیت و کراتوکونوس شناسایی شده‌اند (۲۳).

کراتوکونوس (قوز قرنیه) که تقریباً از اواسط قرن نوزدهم شناخته شده، عبارت است از اکتازی (Ectasia) غیرالتهابی

که امکان شناسایی پروتئینهای جدیدی که سهمی در آسیب‌شناسی بیماری داشته باشند؛ افزایش یابد. برای نیل به این هدف، پروتئوم اشک بدون استفاده از روشهای نشاندار کردن رایج پروتئینها که نیازمند صرف هزینه‌های بالا و زمان‌پردازش طولانی هستند؛ با بهره‌گیری از تکنیک ژل الکتروفورز یک بعدی و کروماتوگرافی مایع-طیف-سنجی جرمی متوالی ارزیابی و با شناسایی و مقدار سنجی پروتئوم، تفاوت‌های آماری معنی‌دار در سطح بیان پروتئینهای شاهد و بیمار تعیین شد. با بررسیهای انجام شده به نظر می‌رسد این پژوهش اولین مطالعه در خصوص نمونه اشک بیماران مبتلا به قوز قرنیه است که با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز یک بعدی و کروماتوگرافی مایع-طیف-سنجی جرمی متوالی (ID-SDS PAGE & LC-MS/MS) بر روی نمونه‌های بومی انجام می‌شود.

مواد و روشها

جمعیت مورد مطالعه و ارزیابی بالینی بیماران. این پژوهش همسو با موازین اخلاقی بیانیه هلسینکی سال ۱۹۶۴ انجام شد. تمام روشهای آزمایشی پس از بررسی و تأیید کمیته اخلاق تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس اجرا شدند. پس از شفاف سازی تمام جنبه‌های تحقیق، امضای فرم رضایت‌نامه آگاهانه از همه داوطلبان شرکت‌کننده اخذ شد. معیارهای ورود به مطالعه شامل: الف) بیماران مبتلا به قوز قرنیه. ب) افراد سالم با نقشه‌های توپوگرافی (Topography) طبیعی قرنیه. معیارهای خروج از مطالعه شامل: ۱) مداخله قبلی جراحی در بخش قدامی چشم، بیماری یا آسیب به قرنیه در دوران کودکی. ۲) وجود التهاب فعال و یا سیستمی، بیماری چشمی، درمان با داروهای ضد التهاب سیستمی یا موضعی. ۳) شرایطی که بر روی ترکیب اشک تأثیر بگذارد مانند استفاده از لنزهای تماسی. ۴) بیماری سیستمی. ۵) سابقه آسیبهای شیمیایی و یا تأخیر در بهبود اپی‌تلیوم. ۷) بارداری یا شیردهی در طول مطالعه برای بیماران زن، بودند. در مجموع تعداد ۵۲ نفر

یک نفر از جمعیت مذکور علائم بیماری را داشته‌است (۸ و ۱۸). جدای از آن، تحقیقات مختلفی در ارتباط با اپیدمیولوژی (Epidemiology) بیماری قوز قرنیه در ایران انجام شده‌است. گزارش‌های ارائه شده از شهرهای یزد، تهران، مشهد و شاهرود، میزان بالای شیوع این بیماری را نشان می‌دهند؛ به نحوی که متأسفانه این میزان بسیار بیشتر از آمار جهانی بوده‌است (۴۹). این موضوع، مطالعه در حوزه این بیماری در کشور را امری بایسته و شایان توجه کرده‌است.

به دلیل ارتباط نزدیک اشک با وضعیت آسیب‌شناختی فیزیولوژیک بسیاری از بیماریهای سطح چشم، تغییرات ناشی از وقایع تأثیرگذار، در ترکیب اجزای تشکیل دهنده لایه‌های مختلف اشک منعکس می‌شوند. بنابراین، مطالعه مقایسه‌ای این تغییرات در افراد مبتلا به قوز قرنیه نسبت به افراد سالم یکی از زمینه‌های تحقیقاتی بوده که در سالهای اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است (۲۵ و ۴۶). انواعی از استراتژیهای متعدد پروتئومیکسی در جهت شناسایی ترکیب پروتئینی اشک و به دنبال آن تعیین نشانگرهای پروتئینی برای بیماریهای چشمی توسعه یافته‌اند. این رویکردها در شناخت نحوه تنظیم عملکردهای سلولی از طریق سیگنال‌دهی و پاسخ به محرکها یا تنشهای خاص، درک فرآیندهای سلولی مانند تکثیر، آپوپتوز، تحرک و تمایز و همچنین تغییرات پروتئینی مرتبط با حالت بیمار در مقابل وضعیت نرمال اهمیت ویژه‌ای دارند (۱۳، ۳۰ و ۴۵). در سالهای اخیر نیز، برای مقایسه پروتئینهای اشک بین افراد مبتلا به قوز قرنیه و افراد نرمال از روشهای مختلف پروتئومیکسی استفاده شده‌است و تفاوت در شناسایی تعداد کلی پروتئینها و زیرمجموعه‌های پروتئینی تمایزی به روشهای جمع‌آوری نمونه اشک و رویکردهای مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل نمونه‌ها مرتبط است (۲۴). در این پژوهش با به کارگیری یکی از تکنیکهای توانمند مبتنی بر طیف‌سنجی جرمی، تلاش شد تا مطالعه پروتئوم اشک به صورت جامع‌تری مورد بررسی قرار بگیرد، با این هدف

درصد، در شرایط دناتورده و احیایی با اعمال ولتاژ ثابت ۸۰ ولت برای ژل استاکنینگ و ۲۰۰ ولت برای ژل تفکیک کننده به مدت تقریبی ۶۰ دقیقه جداسازی شدند. باندهای پروتئینی جدا شده بر روی ژل، با استفاده از روش رنگ آمیزی آبی کوماسی کلونیدی (Colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250) آشکار شدند. مطابق با الگوی تفکیک باندهای پروتئینی، هر ژل به ۵ قطعه و هر قطعه به تکه‌های ریزتر ۱ میلی متری بریده شد. در ادامه، تکه‌های ژل مربوط به هر قطعه، جهت آماده شدن برای آنالیز با طیف‌سنجی جرمی، به‌طور جداگانه مورد پردازش‌های بعدی قرار گرفتند. به صورت خلاصه، تکه‌های ژل با اضافه کردن بیکربنات آمونیوم و اتانول مطلق آبگیری شدند، سپس احیا و آلکیل‌کردن باندهای دی سولفید به ترتیب با اضافه کردن ۱۰ میلی‌مولار DTT و ۵۵ میلی‌مولار یدواستامید حل شده در بیکربنات آمونیوم ۵۰ میلی‌مولار انجام شد. در ادامه، هضم پروتئولیتیکی پروتئینها توسط تیمار با آنزیم تریپسین اصلاح شده (Promega, Madison, USA) به مدت ۱۹ ساعت در دمای ۳۷ درجه صورت گرفت. در نهایت، پروتئولیز، توسط اسیدی سازی مخلوط واکنش با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۱ درصد تری فلئوریک اسید) متوقف شد. محلول رویی حاوی پپتیدها جمع‌آوری و پپتیدهای باقی‌مانده در تکه‌های ژل با دو بار شستشوی ۲۰ دقیقه ای در بافر استخراج (۱:۱ استونیتریل و تری فلئوریک اسید) و یک مرحله نهایی شستشو با استونیتریل خالص بازیابی شدند. محلولهای رویی مربوط به هر مرحله، جمع‌آوری گردید و در (Eppendorf, SpeedVac, Darmstadt, Germany) خشک و تغلیظ شدند. نمونه‌ها تا زمان آنالیز توسط طیف‌سنجی جرمی در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

پالایش نمونه پپتیدی توسط ستون معکوس اکتادسیل: پپتیدهای استخراج شده بر روی ستونهای فاز معکوس C18 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) دست‌ساز پالایش شدند. این فرآیند برای هر نمونه سه مرتبه تکرار

برای انجام تستهای کلینیکی در این تحقیق شرکت کردند که در نهایت با در نظر گرفتن معیارهای ورود و خروج از مطالعه، ۱۴ نفر (۹ بیمار و ۵ سالم) برای جمع‌آوری نمونه اشک انتخاب شدند. قابل ذکر است که افراد تشکیل دهنده گروه بیمار در این پژوهش درجه یکسانی از شدت بیماری را داشتند.

نمونه‌گیری و مراحل پردازش نمونه اشک: تست شیرمر ۱ (Optitech Eye Care, Allahabad, India) بدون استفاده از قطره بیحسی موضعی برای جمع‌آوری نمونه‌های اشک افراد داوطلب مورد استفاده قرار گرفت. با قرار دادن یک نوار کاغذی استریل در پلک پایین نمونه‌گیری انجام شد در حالی که تلاش شد از تحریک ترشح اشک رفلکسی جلوگیری شود (۱۹). نوارهای حاوی اشک بلافاصله منجمد شده و تا پردازش بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌طور خلاصه، استخراج پروتئوم اشک با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر از محلول بیکربنات آمونیوم ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر مخلوط کوکتل مهار کننده پروتئازی (با غلظت ۱۰۰X- بدون EDTA) (Thermo Scientific™ Pierce, Rockford, IL) و ۱ میکرولیتر از محلول EDTA (۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۸) انجام شد. سپس پروتئینها با افزودن ۴ حجم از استون ۸۰ درصد و انکوباسیون شبانه در دمای ۲۰- درجه رسوب داده شدند. در انتها به رسوب پروتئینی ۲۰-۳۰ میکرولیتر از بافر انحلال نمونه (حاوی غلظت ۱X سدیم دودسیل سولفات و ۵۰ میلی‌مولار احیاگر DTT) اضافه و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. در ادامه غلظت پروتئین کل در هر یک از نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد (Thermo Scientific™ Pierce, Rockford, IL) تخمین زده شد (فاکتور رقت = ۶۲/۵).

جداسازی و جزء به جزء کردن بعدی پروتئینها با تکنیک الکتروفورز یک بعدی: میزان ۹۰ میکروگرم از نمونه پروتئین اشک با بارگزاری بر روی ژل الکتروفورز ۱۲

تنظیمات پیش‌فرض برای جستجو شامل: تغییرات ثابت اسیدهای آمینه مانند کربامیدومتیلاسیون سیستئین و تغییرات غیر ثابت مثل اکسیداسیون متیونین و استیلاسیون پایانه N پروتئین، دارا بودن حداقل ۶ اسید آمینه جهت شناسایی پپتیدها، انتخاب آنزیم Trypsin/P، مجاز بودن دو جایگاه برش از دست رفته و اعمال حد آستانه معادل ۱ درصد برای نرخ کشف کاذب جهت شناسایی پروتئین و پپتیدها بودند. مقدارسنجی پپتیدها با بهره‌گیری از الگوریتم MaxLFQ ادغام شده (Integrated) در نرم افزار MaxQuant انجام شد (۴۸). آنالیزهای آماری و بیوانفورماتیکی برای پروتئینهای شناسایی و مقدارسنجی شده، با کمک نرم افزار Perseus نسخه (1.6.2.1) و ابزارهای آنالیز PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships) و STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) انجام شد.

نتایج

به منظور یافتن تغییرات فراوانی پروتئینهای نمونه اشک در دو گروه بیمار و شاهد، مقدارسنجی پپتیدهای حاصل از هضم پروتئولیتیکی پروتئینها بدون نشاندار کردن آنها، با استفاده از تلفیقی از استراتژیهای الکتروفورز یک بعدی و کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی متوالی انجام شد.

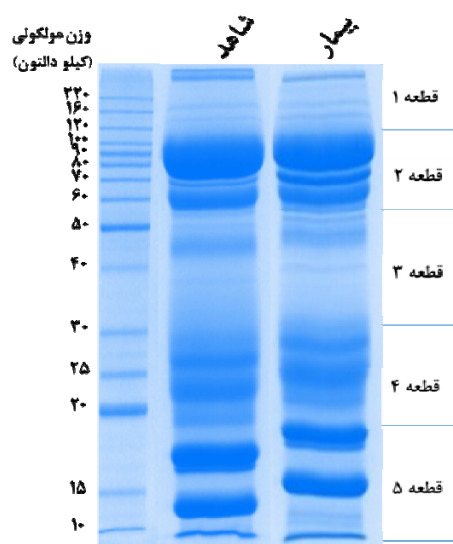
در این پژوهش تعداد ۵۲ نفر برای انجام ارزیابیهای بالینی فراخوانده شدند و در نهایت، مجموعاً ۱۴ نفر (۹ بیمار و ۵ سالم) برای جمع‌آوری نمونه اشک انتخاب شدند. از آنجایی که اغلب افراد مراجعه کننده، مرد بودند بنابراین جمعیت مورد مطالعه تنها شامل جنس مذکر می‌شود. علاوه بر این افراد دو گروه از محدوده سنی یکسانی انتخاب شدند. بر اساس میزان پروتئین مورد نیاز برای هر ژل، پروتئینهای به دست آمده از اشک ۲ تا ۳ فرد به طور تصادفی با هم یکی شدند. غلظت پروتئین کل سنجش شده با روش برادفورد به ترتیب $10/9 \pm 4/05$ و $1/5 \pm 5/36$

گردید و محلول به دست آمده از شستشوی ستون در هر مرتبه جمع‌آوری و در SpeedVac (Eppendorf, Darmstadt, Germany) تا خشک شدن کامل تغلیظ شد. قبل از آنالیز با کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی، پپتیدها با اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ درصد تری فلوروئیک اسید حل شدند.

آنالیز نمونه‌های پپتیدی با کروماتوگرافی مایع-طیف-سنجی جرمی. اتخاذ طیف جرمی نمونه پپتیدی با بارگزاری ۲ میکرولیتر از نمونه خالص شده و حلالهای مورد استفاده به عنوان فاز متحرک شامل حلال A (آب با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی و ۰/۱ درصد حجمی/حجمی اسید فرمیک) و حلال B (استونیتریل با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع-طیف-سنجی جرمی و ۰/۱ درصد حجمی/حجمی اسید فرمیک) در دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی متوالی (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) صورت گرفت. شیب ۶۰ دقیقه‌ای به کار رفته در آنالیز هر نمونه به شرح زیر بود: ۰-۵ دقیقه: ۱۰ درصد حلال B، ۴۵-۵ دقیقه: ۴۵-۱۰ درصد حلال B، ۵۰-۵۵ دقیقه: ۴۵-۹۰ درصد حلال B، ۵۵-۶۰ دقیقه: ۵۵-۱۰ درصد حلال B.

آنالیز داده‌های خام به دست آمده از طیف‌سنجی جرمی متوالی: طیف کروماتوگرام خام به دست آمده، با استفاده از نرم افزار محاسباتی MaxQuant (نسخه ۱، ۰، ۶، ۱) و موتور جستجوی پپتیدی آن، آندرومدا (Andromeda) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به این منظور، الگوریتم شدت سیگنال به دست آمده از مقدارسنجی بدون نشانه گذاری (Label-Free Quantification intensity) پروتئینها، برای شناسایی پپتیدها به کار گرفته شد. جستجوی طیف جرمی متوالی با استفاده از پایگاه داده UniProtKB انسانی (تاریخ انتشار ۲۰۱۴/۵/۲۹) و یک فایل حاوی لیستی از آلوده کننده‌های شایع نمونه‌های پروتئوم انجام شد.

از نمونه‌ها به عنوان چالش مهمی در تجزیه و تحلیل آنها باقی خواهد ماند (۱۷).



شکل ۱- پروتئوم اشک دو گروه شاهد و بیمار جدا شده بر روی ژل الکتروفورز یک بعدی. خطوط نشان دهنده محل‌های برش ژل به ۵ قطعه می‌باشد. قطعه‌های شماره ۲ و ۵ موقعیت پروتئین‌های دارای فراوانی بالا را نشان می‌دهند، با برش ژل به چند قطعه، اثر پوشاندگی پروتئین‌های موجود در این دو قطعه بر روی ردیابی سایر پروتئین‌ها کاهش خواهد یافت.

مرور کلی یافته‌های پروتئومیکسی در پژوهش حاضر:
آنالیز قطعه‌های ژل با ابزار کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی متوالی، تعداد ۱۱۲۵ پروتئین غیر تکراری با ضریب اطمینان بالا را شناسایی کرد. میزان واریانس پروتئوم بین گروه‌ها، با محاسبه ضریب همبستگی پیرسون مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، از شدت سیگنال (متناظر با سطح بیان پروتئین) مستخرج از تجزیه و تحلیل با نرم افزار MaxQuant استفاده شد. مقادیر ضریب همبستگی خطی پیرسون محاسبه شده برای هر ۶ نمونه در نمودار Multi-scatter نشان داده شده‌اند (شکل ۲ الف)). به طور کلی، مقایسه اعداد متناظر با ضریب همبستگی پیرسون حاکی از تکرارپذیری بالایی کل کار آزمایشی و شباهت بالای نمونه‌ها در هر گروه می‌باشد؛ به نحوی که میانگین ضریب همبستگی پیرسون بین ۳ تکرار مستقل از گروه شاهد و

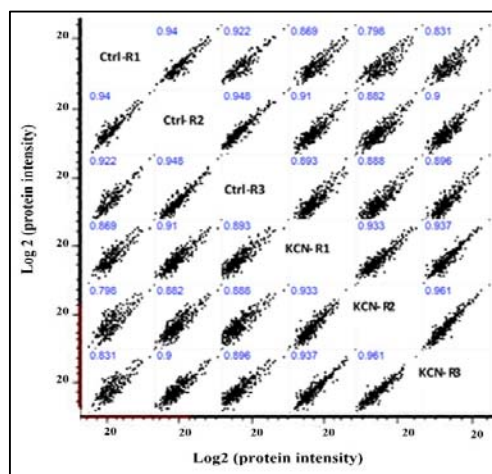
میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای گروه شاهد و بیمار بود که این مقادیر با مقادیر گزارش شده پیشین که حاکی از کاهش ۵۰ درصدی غلظت پروتئین در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد بودند، مطابقت دارد (۱۳).

نمایه پروتئینی نمونه اشک جدا شده بر روی ژل الکتروفورز یک بعدی. الگوی باندهای پروتئینی و مرزهای برش هر قطعه در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در تصویر مشخص است، قطعه‌های شماره ۲ و ۵ نمایانگر حضور تعدادی از پروتئین‌های فراوان تر نسبت به سایر پروتئین‌ها هستند. با تقسیم کردن هر ژل به ۵ قطعه و آنالیز هر قطعه به صورت جدا از دیگر قطعه‌ها، اثر پوشاندگی سیگنال حاصل از حضور این گروه از پروتئین‌ها با فراوانی بالا بر سیگنال ایجاد شده توسط دسته دیگر از پروتئین‌ها که فراوانی کمتری دارند؛ خنثی خواهد شد و از این راه شناسایی تعداد بیشتری از پروتئین‌ها ممکن می‌شود. اثر پوشاندگی ناشی از حضور تعدادی از پروتئین‌ها با فراوانی بالا، آشکارسازی نشانگرهای زیستی پروتئینی که معمولاً در غلظت‌های پایین وجود دارند، را تحت تأثیر قرار می‌دهد. دامنه پویایی گسترده غلظت پپتیدها و پروتئین‌هایی که در یک سیستم زیستی حضور دارند، گلوگاه اصلی برای کشف نشانگرهای زیستی جدید است.

در بسیاری از مطالعات پروتئومیک، دامنه پویای وسیع پروتئین‌ها در اشک انسان به ویژه حضور چندین پروتئین در مقادیر بالا نسبت به سایر پروتئین‌ها، می‌تواند از شناسایی موفق نشانگرهای زیستی با فراوانی کمتر ممانعت به عمل آورد؛ از این رو، روش‌های مختلف جزء به جزء کردن، حذف یا غنی سازی برای ساده سازی نمونه‌های زیستی ناهمگون و پیچیده توسعه یافته‌اند. از آنجایی که هنوز پیچیدگی نمونه‌ها از ظرفیت سیستم‌های تحلیلی موجود کنونی تجاوز می‌کند، در مجموع فرآیند آماده‌سازی برخی

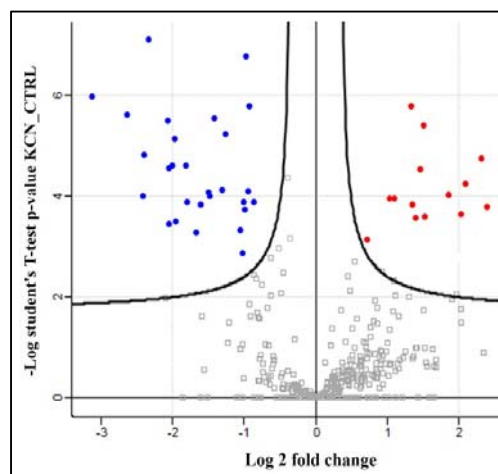
نمودار مقدار کسر تغییرات پروتئینها بر روی محور X و عدد مربوط به نقاط داده معنی‌دار حاصل از تحلیل آماری تمایزی (-Log(p-value))، بر روی محور Y نمایش داده شده‌اند. برای به تصویر کشیدن داده‌های گرافیکی از یکی از ابزارهای دیداری سازی داده بهره گرفته شد. پس از جایگزین کردن نقاط داده ماتریکسی فاقد مقدار با مقادیر عددی متناظر با استفاده از توزیع نرمال، این نقاط بر اساس نمره Z نرمال شدند و پس از انتخاب پارامترهای فاصله و اتصالات بر اساس معیار Euclidean و Average، نقشه حرارتی نقاط داده با نمودار خوشه‌بندی سلسله مراتبی مرتبط با آن ایجاد شد. با انجام این آنالیز، پروتئینهایی که از نظر مقدار عددی شدت بیان و پروفایل بیانی مشابهت دارند در خوشه‌های واحدی قرار می‌گیرند و تلفیق این خوشه‌ها با هم یک دندروگرام را ایجاد می‌کند.

(الف)



گروه بیمار به ترتیب معادل 0.93 ± 0.01 و 0.94 ± 0.01 است. از سوی دیگر ضریب همبستگی پیرسون بین گروه شاهد و گروه بیمار به طور میانگین متناظر با 0.87 ± 0.03 می‌باشد که حاکی از وجود شباهت کمتر بین پروتئوم گروه شاهد و بیمار است. در مرحله بعد، به منظور شناسایی زیرمجموعه پروتئینی که به طور قابل توجهی در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد تمایز بیان نشان می‌دهند، تحلیل آماری در نرم افزار Perseus با انجام آزمون آماری دو نمونه‌ای ($P < 0.05$) صورت گرفت. از میان ۴۲ پروتئینی که سطح بیان آنها در بیماری قوز قرنیه تحت تأثیر قرار گرفته، به ترتیب ۲۸ و ۱۴ پروتئین کاهش و افزایش بیان نشان دادند. در شکل ۲ (ب) با ترسیم نمودار volcano تفاوت‌های به دست آمده از مقایسه دوگانه پروتئوم گروه بیمار و گروه شاهد به تصویر کشیده شده‌است. در این

(ب)



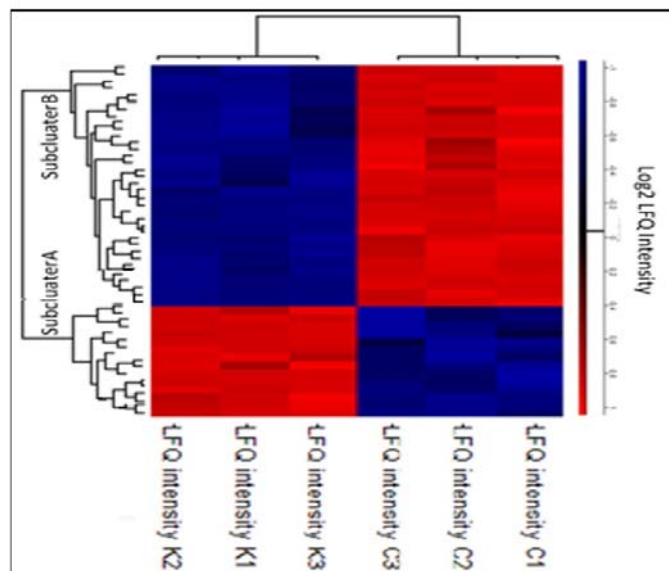
شکل ۲- الف) نمودار multi-scatter که نشان‌دهنده میزان واریانس بین نمونه‌های مورد آزمون می‌باشد. اعداد نمایش داده شده در بالای هر نمودار مقدار ضریب همبستگی پیرسون را نشان می‌دهند. ب) نقاط داده‌ای معنی‌دار از نظر آماری، با دو رنگ قرمز و آبی در شکل نشان داده شده‌اند که به ترتیب نمایانگر نقاط دارای افزایش بیان و نقاط دارای کاهش بیان در گروه بیمار نسبت به گروه شاهد هستند. نرخ کشف کاذب با حد آستانه متناظر با 0.05 و مقدار واریانس SO معادل با 0.1 جهت رسم نمودار استفاده شده است.

تحلیل جامع هسته‌شناسی ژنی مرتبط با موقعیت سلولی (GOCC)، عملکرد مولکولی (GOMF) و فرآیند زیستی (GOBP) این پروتئینها انجام شد. این کار با بهره‌گیری از یک سیستم طبقه‌بندی مبتنی بر وب تحت عنوان سیستم

نقشه حرارتی نشان داده شده در شکل ۳، تفکیک خوشه‌ای سلسله مراتبی نقاط داده را نشان می‌دهد که در آن نمونه‌ها در دو زیر خوشه A و B جدا شده‌اند. در گام بعدی، دسته-بندی پروتئینهای با الگوی بیانی متمایز توسط تجزیه و

و عملکرد آنها می‌باشد. شالوده این منبع داده، یک کتابخانه جامع از درختهای فیلوژنتیکی است که از خانواده‌های ژنی کد کننده پروتئینها ایجاد شده‌اند.

آنالیز پروتئینها با استفاده از روابط تکاملی، PANTHER، صورت گرفت. PANTHER یک منبع داده چندمتغیره برای طبقه‌بندی توالیهای پروتئینی با کمک تاریخچه تکاملی

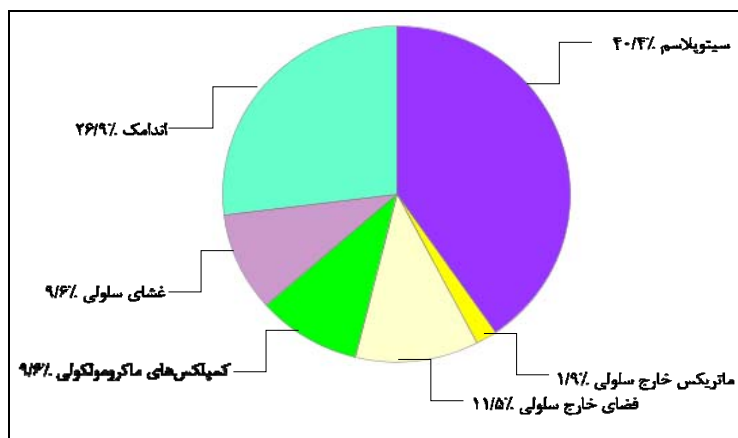
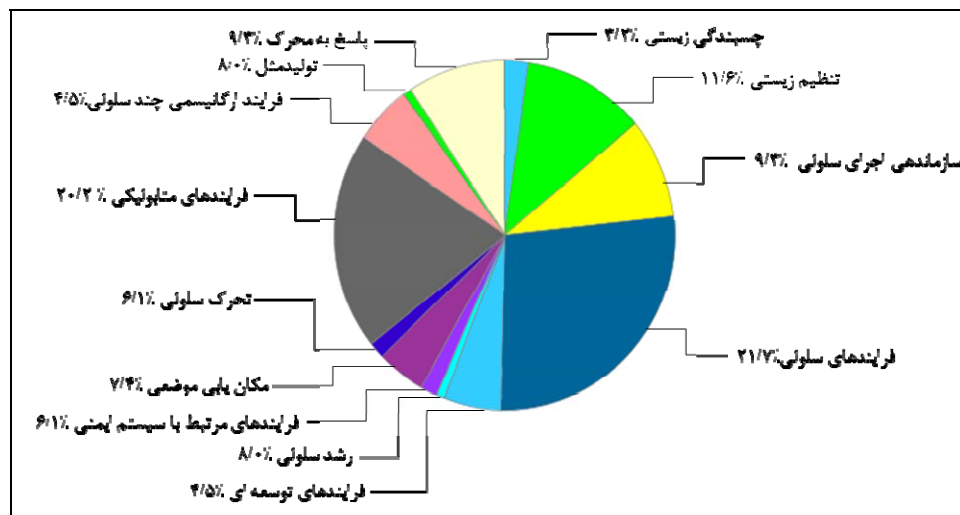


شکل ۳- مقدار شدت بیان ترانسفرورم شده لگاریتمی خطی نرمال شده پروتئینها برای آنالیز و ایجاد نقشه حرارتی و خوشه بندی سلسله مراتبی استفاده شد. در نقشه حرارتی بالا رنگ قرمز و رنگ آبی به ترتیب نشان دهنده افزایش و کاهش بیان پروتئین هستند.

مرتبط با موقعیت سلولی پروتئینهای متمایز در این مطالعه، چندین پروتئین خارج سلولی و سیتوپلاسمی را نشان داد. فراوانی بیشتری از پروتئینهای سیتوپلاسمی و اندامکی از جمله پروتئینهای اسکلت سلولی و شبکه آندوپلاسمی در مقایسه با پروتئینهای خارج سلولی مشاهده شد.

علاوه بر این، تجزیه و تحلیل هسته‌شناسی ژنی مرتبط با عملکرد زیستی این پروتئینها در دو گروه مورد مطالعه، چندین پروتئین دخیل در بیماری با عملکرد ضد باکتریایی، پاسخ ایمنی، مهارکننده پروتئاز و آنزیمهای متابولیکی را نشان داد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده‌است، فرآیندهای زیستی غنی شده در این آنالیز شامل فرآیندهای سلولی (۲۷/۱ درصد)، فرآیندهای متابولیکی (۲۰/۲ درصد)، تنظیم زیستی (۱۱/۶ درصد)، سازماندهی اجزای سلولی (۹/۳ درصد) و پاسخ به محرکها (۹/۳ درصد) و ... هستند.

این ابزار که برای طبقه‌بندی پروتئینها و ژنهای آنها با توان عملیاتی بالا طراحی شده‌است؛ لیستی از ژنهای کد کننده پروتئینهای با بیان متمایز را با ژنهای موجود در یک ژنوم مرجع (در اینجا ژنوم انسان) مقایسه می‌کند و از طریق اطلاعات تعریف شده‌ای که در مورد ویژگیها و عملکردهای زیستی محصولات این ژنها وجود دارد و نیز از راه ارتباط دادن این عملکردها با همدیگر، این پروتئینها را دسته‌بندی می‌کند (۲۷). آنالیز هسته‌شناسی ژنی، عملکرد زیستی محصول پروتئینی را از سه منظر شرح می‌دهد: عملکرد مولکولی (فعالیتها انجام شده توسط محصول ژنی در سطح مولکولی)، اجزاء سلولی (جایگاههای متناسب به ساختارهای سلولی که در آن محصول ژن عمل می‌کند) و فرآیند زیستی (برنامه‌های زیستی که توسط فعالیتها مولکولی چندگانه انجام می‌شوند) (۲۷). خلاصه‌ای از آنالیز هسته‌شناسی ژنی این پروتئینها در شکل ۴ نشان داده شده‌است. به طور کلی، تجزیه و تحلیل هسته‌شناسی ژنی



شکل ۴- آنالیز هسته‌شناسی ژنی مرتبط با تغییرات تمایزی پروتئین‌های شناسایی شده در این مطالعه. سهم هر فرآیند در آسیب‌شناسی فیزیولوژی بیماری در نمودار دایره‌ای بالا در مقیاس درصد مشخص شده است. جایگاه سلولی زیرمجموعه‌های پروتئینی تمایزی نیز در نمودار دایره‌ای پایین نشان داده شده است.

که بر وجود ارتباط بین دو ژن با امکان بیشتر از ۷۰ درصد دلالت دارد. برای این شبکه، ۵ خوشه پروتئینی مجزا ایجاد شد و پروتئین‌هایی که میانگینی با دیگر پروتئین‌ها نداشتند، از شبکه حذف شدند (شکل ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

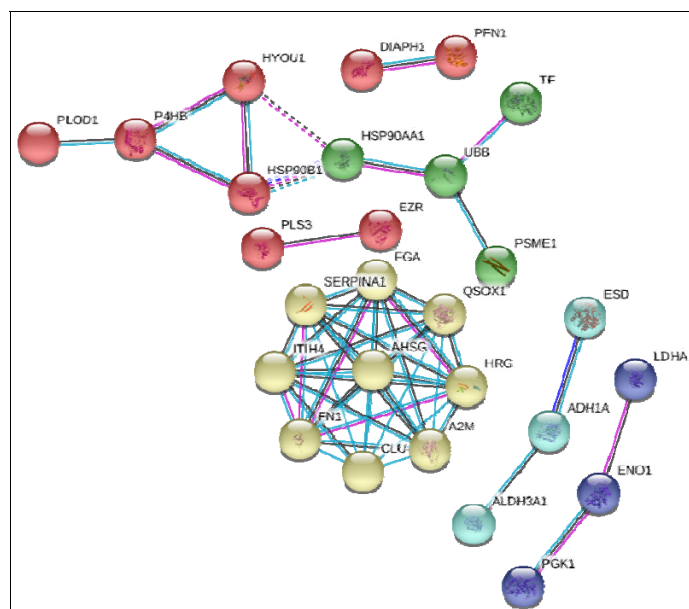
در این پژوهش تغییرات پروتئوم آشک بین دو گروه شاهد و بیمار با به کارگیری تکنیک الکتروفورز ژلی یک بعدی و کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی مورد مطالعه قرار گرفت.

برای نشان دادن نقش محصولات ژنی در مسیرهای زمینه-ساز و پیش‌برنده بیماری قوز قرنیه که در این تحقیق به عنوان پروتئین‌های با الگوی بیانی متمایز شناسایی شده‌اند؛ تحلیل ارتباطی-عملکردی ژنها انجام شد. شبکه تعاملات عملکردی متقابل بین پروتئین‌های با الگوی بیانی متمایز با استفاده از منبع پایگاه داده آنالیز STRING (STRING-<http://string-db.org>) ترسیم شد.

حد آستانه‌ای که برای ایجاد شبکه تعاملی پروتئینی تعیین شد معادل میزان بالای اطمینان یعنی ۰/۷ (حداقل امتیاز مورد نیاز برای ایجاد میانگین متقابل بین دو پروتئین) بود،

در مجموع ۱۱۲۵ پروتئین در نمونه اشک هر دو گروه شناسایی شد که نشان دهنده حضور فراوان پروتئین در اشک می‌باشد. در این پژوهش، علاوه بر تأیید تغییرات تعدادی از گزینه‌های پروتئینی گزارش شده قبلی، پروتئین‌های جدیدی شناسایی گردیده‌اند که تاکنون در بیماری‌زایی قوز قرینه گزارش نشده بودند. در گزارش‌های اخیر با به کارگیری تکنیک‌های قدرتمند مبتنی بر طیف

سنجی جرمی، عدد پروتئوم اشک نرمال انسان به طور معنی‌داری به حدود ۲۰۰۰ پروتئین افزایش یافته‌است که بیش از ۹۰ درصد از کل این مجموعه را پروتئین‌های LYZ (لیزوزیم)، LTF (لاکتوترانسفرین)، LCN1 (لیپوکالین)، SIGA (ایمونوگلوبولین آ ترشحی)، LACRT (لاکرتین) و PRPs (پروتئین‌های غنی از پرولین) تشکیل می‌دهند (۱۲،۴۰).



شکل ۵- شبکه میانکنش‌های متقابل پروتئین‌های تمایزی در دو گروه بیمار و کنترل. گره‌های فاقد میانکنش از شبکه حذف شدند و تنها پروتئین‌های دارای تعامل متقابل باقی ماندند که در ۵ مدل مجزا خوشه‌بندی شدند.

گزارش شده‌اند (۵، ۷، ۸ و ۲۷) و تعدادی دیگر برای اولین بار در این پژوهش شناسایی شده‌اند. لیست کامل نام ژن، میزان تفاوت بین دو گروه و نیز مقدار p-value به دست آمده برای پروتئین‌های تمایزی در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌است.

در ادامه به خلاصه‌ای از عملکرد فیزیولوژیک این پروتئین‌ها پرداخته می‌شود. در شبکه میانکنش‌های پروتئین-پروتئین مرتبط با این مجموعه پروتئین‌های تمایزی، پس از حذف اجزایی که تعاملی با سایرین نداشتند؛ ۵ خوشه میانکنش پروتئینی ایجاد شد.

پروتئین‌هایی که در مقایسه با افراد نرمال، در افراد بیمار افزایش بیان داشته‌اند شامل: PSME1، UBB، DIAPH1، PGLS، CLIC1، PDLIM1، AHSG، PODXL، FN1، GSN، LDHA، CTBS، JVL و LGALS3 می‌باشند. و در مقابل زیرمجموعه پروتئین‌هایی که کاهش بیان داشته‌اند؛ PSAP، PLSS، AKR1C2، PLOD1، HSP90B1، ITIH4، NUCB2، TKT، A2M، ALDH3A1، HRG، HYOU1، SERPINA1، ANXA1، PFN1، ENO1، ESD، CLU، EZR، TGM2، HSP90AA1، ADH1A، SLIT3، B4GALT4، QSOX1، PGK1 را شامل می‌شوند. از این تعداد پروتئین تمایزی، چندین مورد قبلاً

جدول ۱- پروتئین‌های تمایزی پس از انجام آزمون آماری دو نمونه‌ای ($P < 0.05$)

شماره	نام ژن	میزان تفاوت بین دو گروه	-Log student's T-test p-value KCN_CTRL
۱	PSME1	۱/۳۲۷۳۳	۵/۷۷۴۹۳
۲	UBB	۱/۰۲۸۷۲	۳/۹۵۹۳۱
۳	DIAPH1	۱/۵۲۵۵۶	۲/۹۳۱۸۳
۴	FN1	۱/۴۹۹۴۳	۵/۳۸۵۱۴
۵	PODXL	۱/۰۹۷۱۲	۳/۹۴۰۶۹
۶	AHSG	۱/۲۱۰۸	۵/۰۳۰۳۵
۷	PDLIM1	۰/۹۷۷۲۳۷	۴/۸۵۵۲۱
۸	CLIC1	۱/۳۹۰۸۴	۳/۵۷۷۲۹
۹	PGLS	۱/۸۶۰۰۸	۴/۰۱۶۸۷
۱۰	LDHA	۲/۳۸۶۱۵	۳/۷۸۷۱۷
۱۱	GSN	۲/۰۹۸۳۶	۴/۲۳۲۴۸
۱۲	IVL	۱/۳۴۸۰۵	۳/۸۲۴۴۴
۱۳	CTSB	۱/۵۲۹۰۱	۳/۵۸۷۶۷
۱۴	LGALS3	۱/۱۹۴۶	۴/۷۵۶۷۵
۱۵	TGM2	-۰/۸۹۰۶۴۹	۴/۵۵۸۴۴
۱۶	EZR	-۱/۰۵۸۵۶	۳/۳۲۸۴۳
۱۷	HSP90B1	-۱/۲۷۴۵۴	۳/۳۶۲۱۹
۱۸	CLU	-۱/۶۷۴۳۹	۴/۹۷۵۱
۱۹	ESD	-۰/۷۸۸۵۲۵	۴/۳۷۹۸۱
۲۰	HSP90AA1	-۱/۰۱۷۷۳	۲/۸۷۴۰۳
۲۱	PFN1	-۱/۳۹۴۳۷	۴/۹۷۶۷۳
۲۲	P4HB	-۰/۹۷۲۶۱۶	۶/۷۶۷۵۷
۲۳	ENO1	-۱/۰۱۰۰۹	۳/۸۸۱۹۶
۲۴	HRG	-۰/۹۴۹۶۶	۴/۱۰۳۲۸
۲۵	ANXA1	-۲/۶۳۰۴	۵/۶۰۱۳۶
۲۶	FGA	-۲/۰۴۲۸۱	۴/۵۴۲۳۱
۲۷	SERPINA1	-۰/۹۲۸۲۴۷	۵/۷۷۹۷۲
۲۸	PGK1	-۰/۵۱۶۹۸۱	۲/۹۷۲۴۶
۲۹	ADH1A	-۲/۰۵۲۱۹	۳/۴۵۸۳۶
۳۰	SLIT3	-۱/۶۲۷۳۶	۲/۹۰۷۵۶
۳۱	B4GALT4	-۱/۶۶۹۷۲	۳/۲۸۹۷۱
۳۲	QSOX1	-۱/۱۷۳۷۷	۳/۵۳۴۸۵
۳۳	A2M	-۱/۱۸۱۱۸	۴/۳۱۳۹۳
۳۴	ALDH3A1	-۱/۵۲۸۷۹	۴/۳۳۳۴۷
۳۵	HYOU1	-۱/۴۹۴۹۹	۴/۰۶۶۶۸
۳۶	NUCB2	-۱/۷۸۹۰۷	۳/۸۸۷۲

۴/۸۲۱۱۶	-۲/۳۹۵۱۸	TKT	۳۷
۵/۱۹۹۵۸	-۲/۳۶۲۲۶	ITIH4	۳۸
۴/۶۰۰۴۷	-۱/۸۰۸۵۲	PLOD1	۳۹
۳/۸۷۹۲۵	-۰/۸۵۸۸۵	AKR1C2	۴۰
۳/۴۹۷۷۹	-۱/۹۵۰۷	PLS3	۴۱
۵/۴۸۱۲۷	-۲/۰۶۵۹۲	PSAP	۴۲

دیگری که در آسیب‌شناسی بیماری قوز قرنیه و نازک شدن قرنیه در این بیماری دخیل می‌دانند افزایش مرگ سلولی برنامه ریزی شده یا آپوپتوز کراتوسیت‌های استرومای قرنیه است (۲۱). برخلاف قرنیه نرمال که میزان آپوپتوز در آن تقریباً ناچیز و قابل اغماض است اما در قوز قرنیه حجم گسترده‌ای از آپوپتوز کراتوسیت‌ها مشاهده شده است (۹). چند پروتئین که در مطالعه حاضر تغییر بیان نشان دادند و به نظر می‌رسد سهمی در افزایش میزان آپوپتوز مشاهده شده در بیماری قوز قرنیه داشته باشند شامل CLU، GSN و ANXA1، P4HB، HSP90AA1، HSP90B1 هستند. چهار پروتئین اول که همگی کاهش بیان داشته‌اند، چاپرون‌های مولکولی هستند که در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها نقش دارند. کاهش P4HB یا PDI که از چاپرون‌های شبکه آندوپلاسمی است و در پاسخ پروتئین تاخوردگی نقش دارد، حاکی از افزایش استرس شبکه آندوپلاسمی در نتیجه افزایش تجمع پروتئین‌های تاخوردگی و همزمان با آن افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی در شبکه آندوپلاسمی است. در صورت تداوم فعالیت پاسخ پروتئین تاخوردگی، این شرایط منجر به استرس مزمن شبکه آندوپلاسمی گردیده و سلول به سمت آپوپتوز پیش می‌رود (۱۶ و ۲۰). CLU یا ApoJ یک گلیکوپروتئین ۷۰-۸۵ کیلو دالتونی با پیوند دی سولفید است و عملکرد آن در ارتباط با پاکسازی باقیمانده‌های حاصل از تخریب سلولی و آپوپتوز می‌باشد. همچنین، این پروتئین یک چاپرون مولکولی است که مسئول کمک به تاخوردگی پروتئین‌های ترشح شده است، در تعاملات سلول-سلول نقش دارد، سه

پروتئین‌های QSOX1، CLU، SERPINA1، FGA، ITIH4، HRG، A2M خوشه شماره ۱ از شبکه را ایجاد می‌کنند. آنالیز هسته‌شناسی ژنی مرتبط با عملکرد مولکولی این پروتئین‌ها شامل تنظیم ترجمه، نقش اتصالاتی و فعالیت کاتالیتیکی می‌شود. چندین عامل زمینه‌ساز اتیولوژی بیماری قوز قرنیه در نظر گرفته می‌شوند هرچند مکانیسم آن هنوز کاملاً شناخته نشده است. سه فاکتور اصلی استرس اکسیداتیو، حضور التهاب و افزایش آپوپتوز سلولی در آسیب شناسی این بیماری سهم هستند (۲۲ و ۴۲). نازک شدن استروما در قوز قرنیه را به افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و کاهش میزان مهارکننده‌های این آنزیم‌ها نسبت می‌دهند. یکی از مهمترین این پروتئازها CTSB و دو تا از مهمترین این مهارکننده‌ها پروتئین‌های SERPINA1 (A1AT) و A2M هستند (۳۲ و ۴۳). در این مطالعه نیز افزایش سطح بیان پروتئاز CTSB و کاهش سطح بیان مهارکننده‌های SERPINA1 و A2M تأیید شد. CTSB یا Cathepsin V/ L2 از خانواده پپتیدازهای CI است و یکی از سیستمین پروتئازهای لیزوزومی است که در فیزیولوژی قرنیه نقش مهمی دارد. گزارش‌هایی مبنی بر حضور مقادیر بالای این آنزیم و آنزیم‌های دیگری از این خانواده در قوز قرنیه وجود دارد (۴۱ و ۴۷). علاوه بر فعالیت پروتئولیزی، تحریک اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژنی توسط Cathepsin نیز نشان داده شده است (۳۴). مقادیر افزایشی گونه‌های فعال اکسیژنی از جمله سوپر اکسیدها توسط فیبروبلاست‌های آسیب دیده قوز قرنیه نسبت به قرنیه سالم تولید می‌شوند (۱۱). فاکتور

سلولهای اپی تلیال در حال تمایز و همچنین افزایش بیان IVL دیگر نشانگر تمایز سلول اپی تلیال در طول التیام جراحی شود (۳۹). علاوه بر اینها، چندین فاکتور رونویسی مؤثر در تنظیم و ایجاد تغییرات بیانی گزارش شده‌اند مانند API و Sp1 که بیان هر دوی این فاکتورها در قوز قرنیه افزایش می‌یابد و به ترتیب بیان پروتئینهای A1AT و IVL را کاهش و افزایش می‌دهند؛ به علاوه، افزایش بیان و فعالیت این فاکتورهای رونویسی منجر به کاهش تکثیر کراتوسیتها و اپی‌تلیوم می‌شود (۳). پروتئینهای ENO1 و PGK1، علاوه بر نقشی که در متابولیسم گلوکز دارند، به عنوان نشانگر تمایز سلولهای بنیادی لایه پایه اپی‌تلیوم شناخته می‌شوند و کاهش آنها در قوز قرنیه می‌تواند نشانه عدم توانایی لایه اپی‌تلیوم از لحاظ رشد و جمعیت‌زایی باشد (۳۶).

خوشه دیگری از شبکه شامل پروتئینهای ALDH3A1، ADH1A و ESD می‌باشد. هر سه این پروتئینها در دفاع آنتی‌اکسیداتی علیه مقادیر افزایش یافته‌ی گونه‌های فعال اکسیژنی نقش دارند. علاوه بر اینها پروتئینهای دیگری که در این مطالعه شناسایی شدند مانند TKT، AKR1C2 و PDLIM1 نیز اجزای سیستم دفاعی علیه استرس اکسیداتیو را تشکیل می‌دهند. دو آنزیم ALDH3A1 و TKT از کریستالینهای قرنیه بوده و سلولهای اپی‌تلیال قرنیه نرمال سطوح بالایی از این کریستالینها را بیان می‌کنند که به ترتیب حدود ۵۰ و ۱۰ درصد از پروتئینهای محلول در آب را تشکیل می‌دهند (۱ و ۳۸). آنزیم ALDH3A1 به طور مستقیم اشعه فرابنفش را جذب کرده و سوبستراهای آلدئیدی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها را سم‌زدایی می‌نماید. این آنزیم در حفاظت پروتئازوم از غیرفعال شدن اکسیداتیو نقش دارد پس مانع انباشت پروتئین و در نتیجه پراکندگی نور در قرنیه می‌شود (۳۱). آسیب به استرومای قرنیه به پدیدار شدن دو فنوتیپ ترمیمی کراتوسیتهای استروما یعنی فیبروبلاست و میوفیبروبلاست منجر می‌شود که بیان پروتئینی متفاوتی از فنوتیپ کراتوسیتی خاموش

ایزوفرم آن که هسته‌ای، سیتوپلاسمی و خارج سلولی هستند، عملکردهای متفاوتی دارند و در فرآیندهای پیش یا ضد آپوپتوزی، تکثیر سلولی و التهاب دخیل هستند (۴۴). دو پروتئین مهم GSN و EZR از خانواده Gelsolin هستند و نقش ضد آپوپتوزی و ضد التهابی دارند. این دو پروتئین در تحرک سلولی نیز اهمیت دارند. برای پروتئین GSN هر دو نقش پیش آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی گزارش شده‌است و بنابراین می‌تواند آپوپتوز را افزایش داده یا مهار کند که این عملکرد به ماهیت شرایط پاتولوژیک، هویت انواع سلولها و بافتهای خاصی که درگیر هستند، بستگی دارد. کاسپاز ۳، پروتئین GSN را به دو قطعه پایانه-N و پایانه-C برش می‌دهد. GSN کامل و دست‌نخورده به اکتین-DNase1 متصل می‌شود و این کمپلکس سه تایی پایدار است، اما قطعه پایانه-N متعلق به پروتئین GSN به طور رقابتی به اکتین در کمپلکس دوتایی اکتین-DNase1 متصل شده و کمپلکس را بهم می‌زند، DNase1 را آزاد می‌کند تا DNA میتوکندری را تخریب و آپوپتوز را تسریع کند (۲۶). پروتئین EZR نیز در تنظیم چسبندگی کانونی نقش دارد و کاهش بیان آن باعث نقص در تشکیل چسبندگیهای کانونی ضروری برای مهاجرت سلولی می‌شود. پروتئین ANXA1 در بازآرایی اسکلت سلولی و مهاجرت سلولها، کاهش التهاب، مهار فعالیت SPLA2-IIA و نیز کاهش آپوپتوز نقش دارد (۳۷). در سطح ریخت-شناسی قرنیه، قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش می‌تواند موجب کاهش تکثیر سلولهای اپی‌تلیال، تغییرات در ضخامت لایه اپی‌تلیوم و استروما شود، که علت آن افزایش آپوپتوز کراتوسیتهای لایه استروما و از دست رفتن ظرفیت متابولیسمی سلولهای قرنیه است (۲ و ۱۰). تعامل دوسویه پروتئینهای LDHA، ENO1 و PGK1 خوشه دیگری را در شبکه پروتئینی ایجاد کرد. آسیب به قرنیه تجمع مقادیر افزوده گونه‌های فعال اکسیژنی را به دنبال دارد که این تغییر شرایط می‌تواند منجر به افزایش بیان LDHA به عنوان نشانگر افزایش استرس اکسیداتیو و

و EZR جزء پروتئین‌های اتصالی به اکتین هستند و در اتصال اسکلت سلولی به غشای پلاسمایی نقش دارند (۱۵).

DIAPH1 یا mDia از خانواده Formin است که بر عکس پروتئین CFL1 با بسپارش رشته‌های اکتین فیبرهای طولی را ایجاد می‌کند. mDia بسپارش اکتین را از طریق یک مکانیزم وابسته به PFN1 وساطت می‌کند و همچنین تثبیت انتهای مثبت میکروتوبولها در طول مهاجرت سلولی را برعهده دارد؛ هدف پروتئین Rho GTPase است و اعمال آن را میانجی‌گری می‌کند. این پروتئینها احتمالاً در ترانسفورماسیون سلولهای کراتوسیت و تنظیم چسبندگیهای سلول-سلول یا سلول-ماتریکس و مهاجرت سلولی نقش ایفاء می‌کنند (۵ و ۶).

به طور کلی یافته‌های این پژوهش علاوه بر تأیید گزارشهای پیشین از چگونگی تغییرات بیان پروتئوم اشک در بیماری قوز قرنیه و نقش احتمالی آنها در بیماری‌زایی آن، گزینه‌های پروتئینی جدیدی را شناسایی کرد که احتمالاً تغییرات آنها می‌تواند در آسیب‌شناسی زیستی قوز قرنیه سهم مهمی داشته باشد.

متناظر خود دارند. برخلاف قرنیه متأثر شده از بیماری قوز قرنیه، کراتوسیت‌های قرنیه نرمال فنوتیپ خاموش دارند. تبدیل از حالت طبیعی به فنوتیپ ترمیمی همراه با کاهش بیان کریستالین‌های قرنیه می‌باشد که ممکن است با از دست دادن شفافیت سلولی همراه گردد. بیان کریستالین ALDH3A1 در فنوتیپ ترمیمی کراتوسیت انسانی در مقایسه با کراتوسیت‌های طبیعی کاهش می‌یابد (۱۴). علاوه براین، کاهش قابل توجه فعالیت آنزیمهای متابولیکی، ADH و ALDH و همچنین آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت قرنیه مانند GSS و GPx پس از قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش در آسیب‌شناسی قوز قرنیه گزارش شده‌اند. پراکسیداسیون لیپیدها، تغییرات پروتئینها و آسیب فراوان به DNA که ماحصل مقادیر افزایش یافته اشعه فرابنفش هستند، به طور جداگانه یا تجمعی می‌توانند منجر به از دست رفتن قدرت بقای سلولهای اپی‌تلیال و افزایش مرگ آپوپتوزی کراتوسیتها شوند (۲۸، ۲۹ و ۳۸).

تعدادی از پروتئینهای مرتبط با پویایی و سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی، نیز در این مطالعه شناسایی شدند که خوشه بعدی از شبکه را ایجاد کرده‌اند. PLS3 یا T Plastin

منابع

- ۱- غلامپور فاروجی، ن.، حداد مشهدریزه، ع.، دولت آبادی، س. (۱۳۹۴). بررسی زیست‌داده‌ای ویژگیهای ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیمهای باکتریایی مؤثر در مقاومت به استرسهای اکسیداتیو. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)*. ۲۹(۴)، ۴۰۹-۴۲۳.
- ۲- صادقی، ا.، بهمنش، م.، شریفی، م.، و همکاران. (۱۳۹۱). القای آپوپتوز رده سلولی کارسینومای مثانه ۵۶۳۷ در اثر تیمار با پودوفیلوتوکسین. *مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)*. ۲۷(۳)، ۳۹۹-۴۰۵.
- 3- Adhikary, G., Crish, J. F., Bone, F., Gopalakrishnan, R., Lass, J., & Eckert, R. L. (2005). An involucrin promoter API transcription factor binding site is required for expression of involucrin in the corneal epithelium in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(4), 1219-1227.
- 4- Ambekar, R., Toussaint Jr, K. C., & Johnson, A. W. (2011). The effect of keratoconus on the structural, mechanical, and optical properties of the cornea. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(3), 223-236.
- 5- Anderson, S., DiCesare, L., Tan, I., Leung, T., & SundarRaj, N. (2004). Rho-mediated assembly of stress fibers is differentially regulated in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Experimental cell research*, 298(2), 574-583.
- 6- Aspenström, P. (2004). Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1742(1-3), 51-58.
- 7- Balasubramanian, S. A., Wasinger, V. C., Pye, D. C., & Willcox, M. D. (2013). Preliminary

- identification of differentially expressed tear proteins in keratoconus. *Molecular vision*, *19*, 2124.
- 8- Barbara, R., Turnbull, A. M., Hossain, P., Anderson, D. F., & Barbara, A. (2017). Epidemiology of keratoconus. In *Keratoconus* (pp. 13-23). Springer, Cham.
 - 9- Bykhovskaya, Y., Gromova, A., Makarenkova, H. P., & Rabinowitz, Y. S. (2016). Abnormal regulation of extracellular matrix and adhesion molecules in corneas of patients with keratoconus. *International journal of keratoconus and ectatic corneal diseases*, *5*(2), 63.
 - 10- Cheung, I. M., McGhee, C. N., & Sherwin, T. (2013). A new perspective on the pathobiology of keratoconus: interplay of stromal wound healing and reactive species-associated processes. *Clinical and Experimental Optometry*, *96*(2), 188-196.
 - 11- Chwa, M., Atilano, S. R., Reddy, V., Jordan, N., Kim, D. W., & Kenney, M. C. (2006). Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science*, *47*(5), 1902-1910.
 - 12- Cox, J., Hein, M. Y., Luber, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., & Mann, M. (2014). MaxLFQ allows accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction. *Molecular & cellular proteomics*, mcp-M113.
 - 13- Cutillas, P. R., & Timms, J. F. (2010). *LC-MS/MS in proteomics: methods and applications*. New York, NY: Humana Press.
 - 14- Estey, T., Piatigorsky, J., Lassen, N., & Vasilou, V. (2007). ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Experimental eye research*, *84*(1), 3-12.
 - 15- Fiévet, B., Louvard, D., & Arpin, M. (2007). ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1773*(5), 653-660.
 - 16- Fini, M. E., Bauskar, A., Jeong, S., & Wilson, M. R. (2016). Clusterin in the eye: an old dog with new tricks at the ocular surface. *Experimental eye research*, *147*, 57-71.
 - 17- Finoult, I., Pinkse, M., Van Dongen, W., & Verhaert, P. (2011). Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. *BioMed Research International*, *2011*.
 - 18- Gokhale, N. S. (2013). Epidemiology of keratoconus. *Indian journal of ophthalmology*, *61*(8), 382.
 - 19- Green-Church, K. B., Nichols, K. K., Kleinholz, N. M., Zhang, L., & Nichols, J. J. (2008). Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Molecular vision*, *14*, 456.
 - 20- Hoffstrom, B. G., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R. S., Turmel, G. J., Lo, D. C., & Stockwell, B. R. (2010). Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nature chemical biology*, *6*(12), 900.
 - 21- Kaldawy, R. M., Wagner, J., Ching, S., & Seigel, G. M. (2002). Evidence of apoptotic cell death in keratoconus. *Cornea*, *21*(2), 206-209.
 - 22- Kenney, M. C., & Brown, D. J. (2003). The cascade hypothesis of keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye*, *26*(3), 139-146.
 - 23- Klintworth, G. K. (1977). The cornea--structure and macromolecules in health and disease. A review. *The American journal of pathology*, *89*(3), 718.
 - 24- Lema, I., Brea, D., Rodríguez-González, R., Díez-Feijoo, E., & Sobrino, T. (2010). Proteomic analysis of the tear film in patients with keratoconus. *Molecular vision*, *16*, 2055.
 - 25- Lema, I., Sobrino, T., Duran, J. A., Brea, D., & Díez-Feijoo, E. (2009). Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears. *British Journal of Ophthalmology*.
 - 26- Mar, P. K., Roy, P., Yin, H. L., Cavanagh, H. D., & Jester, J. V. (2001). Stress fiber formation is required for matrix reorganization in a corneal myofibroblast cell line. *Experimental eye research*, *72*(4), 455-466.
 - 27- Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., & Thomas, P. D. (2016). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic acids research*, *45*(D1), D183-D189.
 - 28- Mootha, V. V., Kanoff, J. M., Shankardas, J., & Dimitrijevic, S. (2009). Marked reduction of alcohol dehydrogenase in keratoconus corneal fibroblasts. *Molecular vision*, *15*, 706.
 - 29- Nielsen, K., Birkenkamp-Demtröder, K., Ehlers, N., & Orntoft, T. F. (2003). Identification of differentially expressed genes in keratoconus epithelium analyzed on

- microarrays. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(6), 2466-2476.
- 30- Ong, S. E., Foster, L. J., & Mann, M. (2003). Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*, 29(2), 124-130.
- 31- Pei, Y., Reins, R. Y., & McDermott, A. M. (2006). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 3A1 expression by the human keratocyte and its repair phenotypes. *Experimental eye research*, 83(5), 1063-1073.
- 32- Pescosolido, N., Barbato, A., Pascarella, A., Giannotti, R., Genzano, M., & Nebbioso, M. (2014). Role of protease-inhibitors in ocular diseases. *Molecules*, 19(12), 20557-20569.
- 33- Rabinowitz, Y. S. (1998). Keratoconus. *Survey of ophthalmology*, 42(4), 297-319.
- 34- Reiser, J., Adair, B., & Reinheckel, T. (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 120(10), 3421-3431.
- 35- Romero-Jiménez, M., Santodomingo-Rubido, J., & Wolffsohn, J. S. (2010). Keratoconus: a review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 33(4), 157-166.
- 36- Soiberman, U., Foster, J. W., Jun, A. S., & Chakravarti, S. (2017). Suppl-1, M9: Pathophysiology of Keratoconus: What Do We Know Today. *The open ophthalmology journal*, 11, 252.
- 37- Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Teixeira, M. M., & Sousa, L. P. (2016). Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *Journal of immunology research*, 2016.
- 38- Swamynathan, S. K. (2013). Ocular surface development and gene expression. *Journal of ophthalmology*, 2013..
- 39- Tong, L., Corrales, R. M., Chen, Z., Villarreal, A. L., De Paiva, C. S., Beuerman, R., ... & Pflugfelder, S. C. (2006). Expression and regulation of cornified envelope proteins in human corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(5), 1938-1946.
- 40- Tong, L., Zhou, X. Y., Jylha, A., Aapola, U., Liu, D. N., Koh, S. K., ... & Zhou, L. (2015). Quantitation of 47 human tear proteins using high resolution multiple reaction monitoring (HR-MRM) based-mass spectrometry. *Journal of proteomics*, 115, 36-48.
- 41- Whitelock, R. B., Fukuchi, T., Zhou, L., Twining, S. S., Sugar, J., Feder, R. S., & Yue, B. Y. (1997). Cathepsin G, acid phosphatase, and alpha 1-proteinase inhibitor messenger RNA levels in keratoconus corneas. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(2), 529-534.
- 42- Wojcik, K. A., Blasiak, J., Szaflik, J., & Szaflik, J. P. (2014). Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Biochimica Polonica*, 61(1).
- 43- Wojcik, K. A., Kaminska, A., Blasiak, J., Szaflik, J., & Szaflik, J. P. (2013). Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 19294-19308.
- 44- Zhao, G., Lu, H., & Li, C. (2015). Pro-apoptotic activities of PDI and PDIA3: a role of Bcl-2 protein Bak. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M114.
- 45- Zhou, L., & Beuerman, R. W. (2012). Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in retinal and eye research*, 31(6), 527-550.
- 46- Zhou, L., & Beuerman, R. W. (2017). The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic.
- 47- Zhou, L., Sawaguchi, S., Twining, S. S., Sugar, J., Feder, R. S., & Yue, B. Y. (1998). Expression of degradative enzymes and protease inhibitors in corneas with keratoconus. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(7), 1117-1124.
- 48- Zhou, L., Zhao, S. Z., Koh, S. K., Chen, L., Vaz, C., Tanavde, V., ... & Beuerman, R. W. (2012). In-depth analysis of the human tear proteome. *Journal of proteomics*, 75(13), 3877-3885.
- 49- Ziaei, H., Jafarinasab, M. R., Javadi, M. A., Karimian, F., Poorsalman, H., Mahdavi, M., ... & Katibeh, M. (2012). Epidemiology of keratoconus in an Iranian population. *Cornea*, 31(9), 1044-1047.

Identification and relative quantification of tear-based proteome alterations affected by Keratoconus

Shafiee S.,¹ Jadidi Kh.² and Khajeh Kh.¹

¹ Dept. of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Ophthalmology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Keratoconus is an asymmetric condition of progressive corneal thinning that typically occurs in early adolescence and has an estimated prevalence of about 1/2,000 in human population. Aimed at revealing alterations in the abundances of tear sample proteins between two patient and control groups, label free quantification of peptides derived from proteolytic digestion of proteins was performed using one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry strategy. The results obtained from statistical analysis, to find differentially expressed proteins, showed that 28 and 14 proteins indicated decrement and increment in their expression levels, respectively. Based on the results of the gene ontology analysis, the biological processes that are mainly involved in the pathology of the disease in association with expression level alterations of the above mentioned subset of proteins, comprise cellular processes (27.1%), metabolic processes (20/2%), biological regulation (11/6%), cellular compartment organization (9/3%) and response to stimuli (9/3%). Moreover, gene ontology analysis associated with the cellular localization of these proteins indicated that a large number of them belong to the intracellular space. Such proteomics studies can help us to improve our basic knowledge in the field of biological processes and provide a deeper understanding of the underlying mechanisms of the diseases.

Key words: Proteomics, Keratoconus, LC-MS/MS, Gene ontology.