مطالعهٔ فعالیت آپوپتوزیس پروتئین هیبرید (A1-GMCSF) برروی رده های مختلف سلولی دارای گیرنده GMCSF

مانا علومی، الهه سادات شریعتی و سعید بوذری*

تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیولوژی مولکولی

تاریخ دریافت: 86/6/22 تاریخ پذیرش: 87/9/25

چکیده

یکی از راهکارهای جدید هدفمند برای درمان بیماریها، مانند سرطان استفاده از موادی به نام ایمونوتوکسین می باشد. ایمونوتوکسینها از دو قسمت هدف گیری و کشندگی تشکیل شده اند. در چند سال اخیر یک راهکار جدید بدین منظور به وجود آمده است و آن استفاده از یک مولکول سیتوتوکسیک بوده که توسط تکنولوژی فیوژن دو ژن صورت می گیرد. این نوع از مولکولها را هیبرید پروتئین نامیده که از دو قسمت هدف گیری و سیتوتوکسیک تشکیل شده است. در این بررسی پروتئین هیبرید که از قبل ساخته شده و از دو قسمت کاتالتیک شیگاتوکسین (A1) و GM-CSF انسانی تشکیل شده است، توسط آرابینوز القا و تخلیص و فعالیت سیتوتوکسیک آن بر روی سلولهای حاوی گیرنده GM-CSF مورد آزمایش قرار می گیرد. برای توجیه و روشنتر شدن فعالیت پروتئین هیبرید، فعالیت آپوپتوزیس آن بر روی این سلولها، ارزیابی می گردد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که پروتئین هیبرید برای رده های سلولی با گیرنده GM-CSF سیتوتوکسیک بوده و غلظتهای مختلف پروتئین باعث القا آپوپتوزیس می گردد. در مجموع نتایج نشان می دهد که پروتئین هیبرید فعالیت سیتوتوکسیک اختصاصی داشته و باعث القا آپوپتوزیس می گردد.

واژه های کلیدی: GM-CSF، آپوپتوزیس، سرطان، ایمونوتوکسین

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 66953311، پست الکترونیک: saeidbouzari@yahoo.com

مقدمه

درمان سرطان بطور معمول شامل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی می باشد و علی رغم تلاشهای مستمر محققان در مبارزه با سرطان، هنوز این بیماری یکی از دلایل اصلی مرگ و میر به شمار می رود. بازدهی درمان حتی با وجود توسعه داروهای جدید ضد سرطان، رضایتبخش نیست؛ بنابراین یک راهکار متفاوت جهت درمان سرطان پیشنهاد شده است (1و2). داروهای خاصی با مکانیسم عمل منحصر بفرد که قادر به ممانعت از بروز مقاومت چندگانه دارویی نسبت به سرطان باشد، مورد نیاز است. یکدسته از این عوامل درمانی توکسینهای فیوژن می باشد که از دو بخش، کشندگی و جهتگیری، بر روی سلول تشکیل شده است. بخش اول که ممانعت از سنتز پروتئین می کند، به لیگاندهای مخصوص سلولهای سرطانی اتصال می یابد. ابتدا این لیگاندها بخش توکسین را به سمت سلولهای هدف هدایت کرده و با اتصال به گیرنده مربوط بخود، اندوسیتوز را بجریان می اندازد سپس بخش توکسین به سیتوزول منتقل و بصورت کاتالیتیکی سنتز پروتئین را غیر فعال می نماید. این امر منجر به مرگ سلول می شود (3). بسیاری از توکسینهای فیوژن، فعالیت سیتوکسیسیتی بالایی توأم با عملکرد اختصاصی نسبت به سلولهای سرطانی کشت شده در محیط آزمایشگاه از خود بروز می دهند. همچنین این عوامل درمانی، باعث پس روی و عقب

نشینی زنوگرافتهای تومور انسانی موجود در موش می شوند (4 و 5).

توکسینهای گیاهی و باکتریایی بخصوص ریسین، توکسین دیفتری و اگزوتوکسین A سودوموناس به عنوان بخشهای توکسینی بکار گرفته شده اند (6). از جمله توکسینهای مشابه دیگر شیگا توکسین متعلق به خانواده توکسینهای AB5 بوده (7) که از زیرواحد A (بخش کاتالیتیک) و زیرواحد B (بخش اتصالی) تشکیل شده است. قطعه A، سنتز پروتئین را پس از رها شدن در سیتوزول با جدا کردن یک آدنین از زنجیره 28S rRNA از زیرواحد بزرگ ریبوزومی 60S مهار می نماید (8). اصلی ترین منابع تولید شیگاتوکسین، شیگلادیسانتری و باکتری اشرشیاکلی سویه O157: H7 می باشد (9).

فاکتور محرک رشد گرانولوسیت- ماکروفاژ انسانی(-hGMCSF,human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)، یک سیتوکین 127 اسیدآمینه ای بوده که مسئول رشد، تمایز و تکثیر سلولهای گرانولوسیت و ماکروفاژ می باشد (10). گیرنده GMCSF (GM-CSFR)، بصورت یک گیرنده هترودیمر شامل زیرواحدهای α و β بیان می شود (11)؛ چنین گیرنده هایی با پراکندگی کم بافتی (narrow tissue distribution) وتمایل بالای اتصالی، هدفهای نویدبخشی جهت عرضه اختصاصی توکسینها به سلولهای ناهنجار می باشند (12).

در این بررسی پروتئین هیبرید که سنتز آن قبلاً صورت گرفته است (13) و از دو قسمت کاتالتیک شیگاتوکسین (A1) و GM-CSF انسانی تشکیل شده است، توسط آرابینوز القا و تخلیص شد و برای فعالیت سیتوتوکسیک خود بر روی سلولها با گیرنده GM-CSF مورد آزمایش قرار گرفت. برای توجیه و روشنتر شدن فعالیت پروتئین هیبرید، فعالیت آپوپتوزیس آن بر روی این سلولها، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

بیان پروتئین: پلاسمید pBAD/gIII A (Invitrogen,USA) در سلول میزبان *E. coli* سویه TOP10 (Invitrogen, USA) جهت بیان پروتئین نوترکیب A1-GMCSF بکار برده شد (12). این ناقل، دارای پروموتور ara-BAD می باشد. جهت القا، غلظتهای مختلف L – آرابنیوز (20-0/002 درصد) مورد استفاده قرار گرفته و بر طبق شرایط ذکر شده در دستورالعمل شرکت Invitrogen عمل گردید.

تخلیص پری پلاسمیک پروتئین A1-GMCSF: پلاسمید pBAD/gIII A دارای سیگنال ابتدایی جهت هدایت پروتئین بیان شده به فضای پری پلاسمیک می باشد. تخلیص پروتئین بواسطه پلی میکسین B (Sigma) صورت گرفت به این صورت که رسوب باکتری در PBS 100µl (Phosphate Buffer Salin) حل گشته، پس از پیپتاژ ملایم، پلی میکسین B (1 درصد) اضافه شد و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد بمدت 1 ساعت نگه داری گردید. سپس نمونه در 8000rpm به مدت 15 دقیقه، سانتریفوژ و محلول رویی جمع آوری گردید.

شناسایی پروتئین نوترکیب A1-GMCSF: پروتئین بیان شده به همراه بافر نمونه در دمای 90 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه حرارت داده شد و بر روی ژل SDS-PAGE (15درصد) برده و توسط کوماسی بلو رنگ گردید، همچنین بر روی کاغذ PVDF (Roche,USA) بلات و در محلول(PBS1X, 0.1% Tween 20, 5% Skim Blocking milk) یک شبانه روز (Over Night) در 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد. کاغذ بلاک شده با PBS1X و 0.1% Tween 20 شسته و سپس با آنتی بادی αMyc-HRP (Invitrogen,USA) با نسبت رقت 1/1000 در دمای اتاق به مدت 2 ساعت انکوبه گشت.

کاغذ جهت بررسی ظهور باند، با استفاده(-3-3 diaminibenzidinetetrahydrochloride)DAB از

(Sigma,USA)H_2O_2,PBS, (Fermentas,USA) مورد بررسی قرار گرفت (Myc پپتید کوچکی انتهای پروتئین نوترکیب می باشد).

خاصیت آنتی ژنسیتی پروتئین بیان شده توسط آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادیهای αA (تهیه شده در بخش) و αGMCSF (R & D,USA) با نسبت رقت 1/1000 برای هر دو در دمای اتاق به مدت 2 ساعت مورد بررسی قرار گرفت. پس از سه مرتبه شستشو، کاغذها به ترتیب با Protein A-HRP و anti-goat IgG-HRP (Dako,Denmark) به عنوان آنتی بادیهای ثانویه (هر دو در رقت 1/5000) در دمای اتاق به مدت 1 ساعت انکوبه شده و جهت شناسایی ظهور باندها مشابه قبل عمل گردید.

کشت سلول: رده های سلولی U937 (لوسمی مونوسیتیک) و K562 (لوسمی اریتروئید) از بانک سلول انستیتو پاستور ایران فراهم شد. این سلولها در محیط RPMI (Gibco-BRL,USA) همراه با آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین (بترتیب،100U/ml و µg/ml 100) کشت داده شدند و FBS 15 درصد (Gibco-BRL,USA) دکمپلمان شده توسط حرارت (45 درجه سانتی گراد به مدت 1 ساعت) به عنوان مکمل غذایی استفاده گردید.

بررسی سیتوتوکسیسیتی: اثر سیتوتوکسیک پروتئین A1-GMCSF بر روی رده های سلولی مذکور (دارای گیرندهGMCSF) توسط سنجشهای نوترال رد و تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت.

بدین منظور، 3×10^4 سلول از هر یک از رده های سلولی U937 و K562 در چاهکهای پلیت 96 خانه ای در محیط RPMI دارای FBS 10 درصد در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد دارای 5 درصد CO_2، کشت داده شد. یکساعت بعد غلظتهای مختلف پروتئین A1-GMCSF (10-200µg) در حجم نهایی 200 µl) به سلولها اضافه شده و یک شبانه روز انکوبه شد. تعداد سلولهای زنده توسط سنجش تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت.

جهت سنجش نوترال رد، محلول نوترال رد (Sigma,USA) با غلظت 80µg/ml (رقیق شده در RPMI) به سلولها اضافه و مجدداً برای 3 ساعت انکوبه گردید. پس از مراحل فیکس و لیز کردن سلولها، میزان سیتوتوکسیسیتی توسط اسپکتروفتومتر نوری در طول موج 450 nm سنجیده شد.

بررسی مکانیسم مرگ سلول: جهت بررسی مکانیسم مرگ سلول از کیت اختصاصی الیزا (Cellular DNA Fragmentation ELISA kit, Roche) و سنجش فلوسایتومتری استفاده گردید. جهت بررسی توسط کیت، 6 فلاسک حاوی 2×10^5 سلول از رده سلولی U937 کشت داده شد (به منظور مطالعه اثر 5 غلظت مختلف از نمونه پروتئینی بعلاوه کنترل). ادامه مراحل طبق دستورالعمل کیت دنبال و میزان جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر نوری در طول موج 450 nm سنجیده و نتایج به صورت نمودار نشان داده شد.

جهت بررسی فلوسایتومتریک، 5×10^5 سلول از رده سلولی K562 پس از تیمار با غلظت 100µgاز نمونه پروتئینی، در PBS شسته شده و در 100µl محلول رنگ شامل (Annexin-V و The Propidium iodide Phosphatidyle Serine Detection kit, IQ) به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق نگه داری گردید. سپس سلولها توسط دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شد.

نتایج

بیان و تخلیص پری پلاسمیک پروتئین A1-GMCSF: پلاسمید pBAD/gIII A در سلول میزبان *E. coli* سویه TOP10 جهت بیان پروتئین نوترکیب A1-GMCSF بکار برده شده است . جهت بهینه کردن میزان بیان پروتئین ، غلظتهای مختلف L – آرابنیوز (20- 0/002 درصد) در زمانهای متفاوت القا مورد استفاده قرار گرفته و سپس

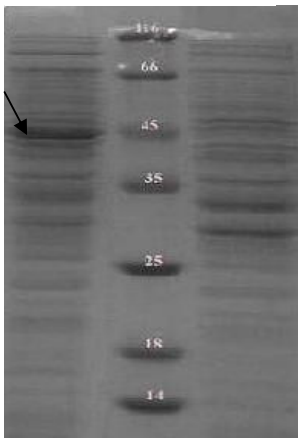
استخراج پروتئین پری پلاسمیک بواسطه پلی میکسینB صورت گرفت.

پروتئین هیبرید A1-GMCSF، از 1-255 اسیدآمینه انتهای آمینی(N-terminal) قطعه A1 (دومین کاتالیتیک شیگاتوکسین) متصل شده به اسیدآمینه های 1-127 از سیتوکین hGM-CSF می باشد (اتصال از طریق ناحیه همپوشان دو ژن صورت گرفته است)، همچنین این پروتئین، اپی توپ *Myc* و منطقه پلی هیستیدین (موجود در پلاسمید pBAD/gIII A) را در بر می گیرد.

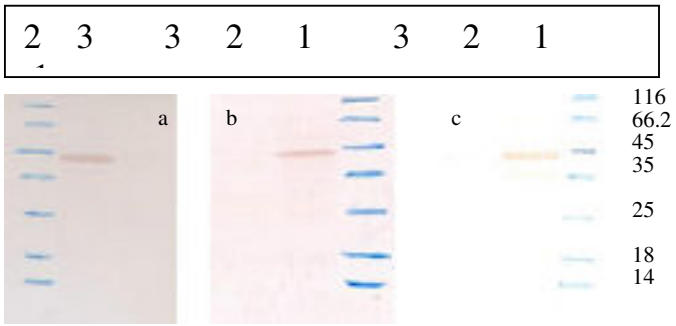
پروتئین بیان شده بر روی ژل 15 درصد SDS-PAGE برده شد و توسط کوماسی بلو رنگ گردید.

وزن ملکولی پروتئین بیان شده حدود 43KD می باشد و بیشترین میزان بیان در غلظت 0/2 درصد آرابینوز در مدت 4 ساعت صورت گرفته است (شکل 1).

شناسایی اختصاصی پروتئین نوترکیب A1-GMCSF: شناسایی اختصاصی پروتئین نوترکیب A1-GMCSF توسط آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی αMyc-HRP و خاصیت آنتی ژنسیتی آن با استفاده از آنتی بادیهای αA و αGMCSF بعنوان آنتی بادیهای اولیه و Protein A-HRP و anti-goat IgG-HRP به عنوان آنتی بادیهای ثانویه. مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که شکل 2 نشان می دهد باند مورد نظر دراندازه 43 KD مورد تأیید قرار گرفت.



شکل 1: پروتئین بیان شده A1-GMCSF بر روی ژل 15 درصد SDS-PAGE،در مدت القا 4 ساعت. چاهک 1 : غلظت 0/2 درصد آرابینوز، چاهک 2 : مارکر پروتئینی، چاهک 3 : کنترل



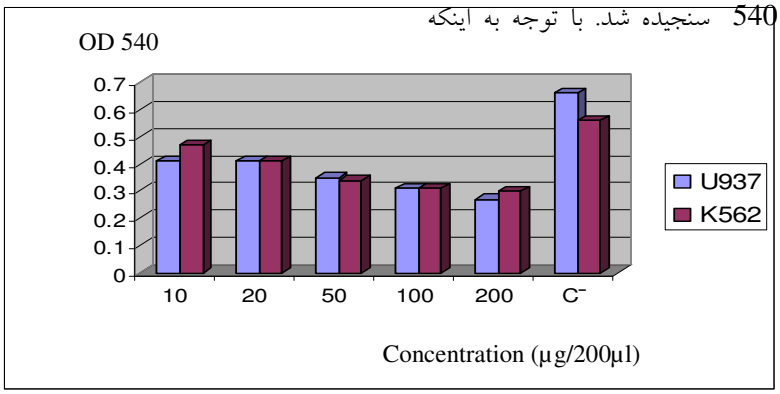
شکل 2: آنالیز وسترن بلات با استفاده از آنتی بادیهای αMyc :a, αA :b و αGMCSF :c

1 : مارکر پروتئینی، 2 : پروتئین A1-GMCSF، 3 : کلون فاقد پروتئین نوترکیب (کنترل)

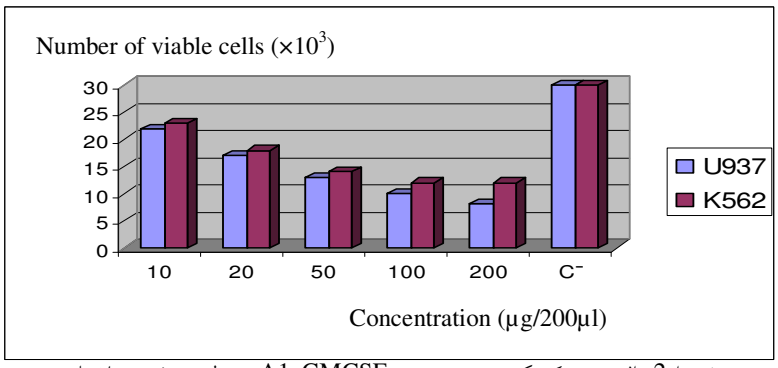
بررسی سیتوتوکسیسیتی: رده های سلولی U937 و K562 از بانک سلول انستیتو پاستور ایران فراهم شده، در محیط RPMI همراه با آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین و FBS 15 درصد کشت داده شد.

اثر سیتوتوکسیک پروتئین A1-GMCSF بر روی رده های سلولی مذکور توسط سنجشهای نوترال رد و تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت. جهت سنجش تریپان بلو، اثر سیتوتوکسیک پس از تیمار سلولها با غلظتهای مختلف (50،100،200،20،10µg) پروتئین A1-GMCSF با

اضافه کردن رنگ تریپان بلو و شمارش سلولها به کمک لام نئوبار بررسی گردید. از آنجا که تریپان بلو سلولهای مرده را رنگ می نماید انتظار می رود با افزایش غلظت پروتئین هیبرید، نسبت سلولهای رنگ شده (به کل سلولها) افزایش یابد و سلولهای رنگ نشده که نمایانگر سلولهای زنده می باشند کاهش یابد. جهت سنجش نوترال رد، محلول نوترال رد به سلولها اضافه شده پس از مراحل فیکس و لیز کردن سلولها، میزان سیتوتوکسیسیتی توسط اسپکتروفتومتر نوری در طول موج 540 nm سنجیده شد. با توجه به اینکه نوترال رد یک رنگ حیاتی محسوب می شود و سلولهای زنده را رنگ می نماید انتظار می رود شدت رنگ و میزان جذب نوری با افزایش غلظت ایمنو توکسین (بدلیل کاهش یافتن سلولهای زنده) کاهش یابد. نتایج نشان داده پروتئین هیبرید، اثر سیتوتوکسیک بر هر دو رده سلولی دارد (نمودارهای1و2) و این اثر با بکارگیری آنتی بادی علیه پروتئین هیبرید، مهار گردید. شکل 3، اثر سیتوتوکسیک g 100µ نمونه پروتئینی را نشان می دهد.



نمودار1 : اثر سیتوتوکسیک پروتئین هیبرید A1-GMCSF توسط سنجش نوترال رد



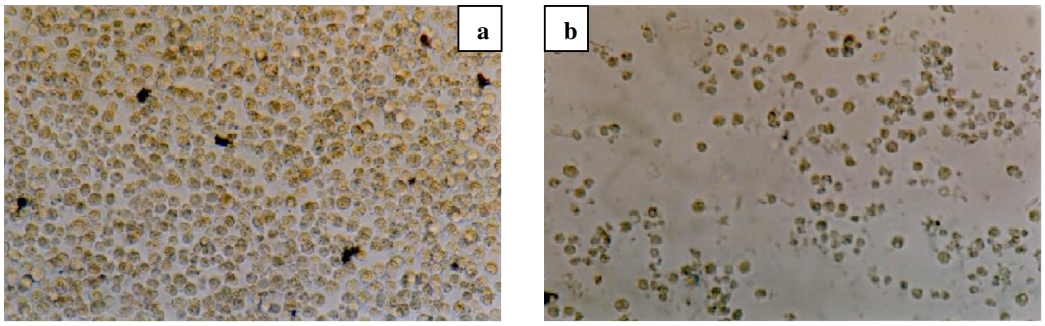
نمودار2 : اثر سیتوتوکسیک پروتئین هیبرید A1-GMCSF توسط سنجش تریپان بلو

بررسی مکانیسم مرگ سلول: جهت بررسی مکانیسم مرگ سلول از کیت اختصاصی الیزا و سنجش فلوسایتومتری استفاده شد.

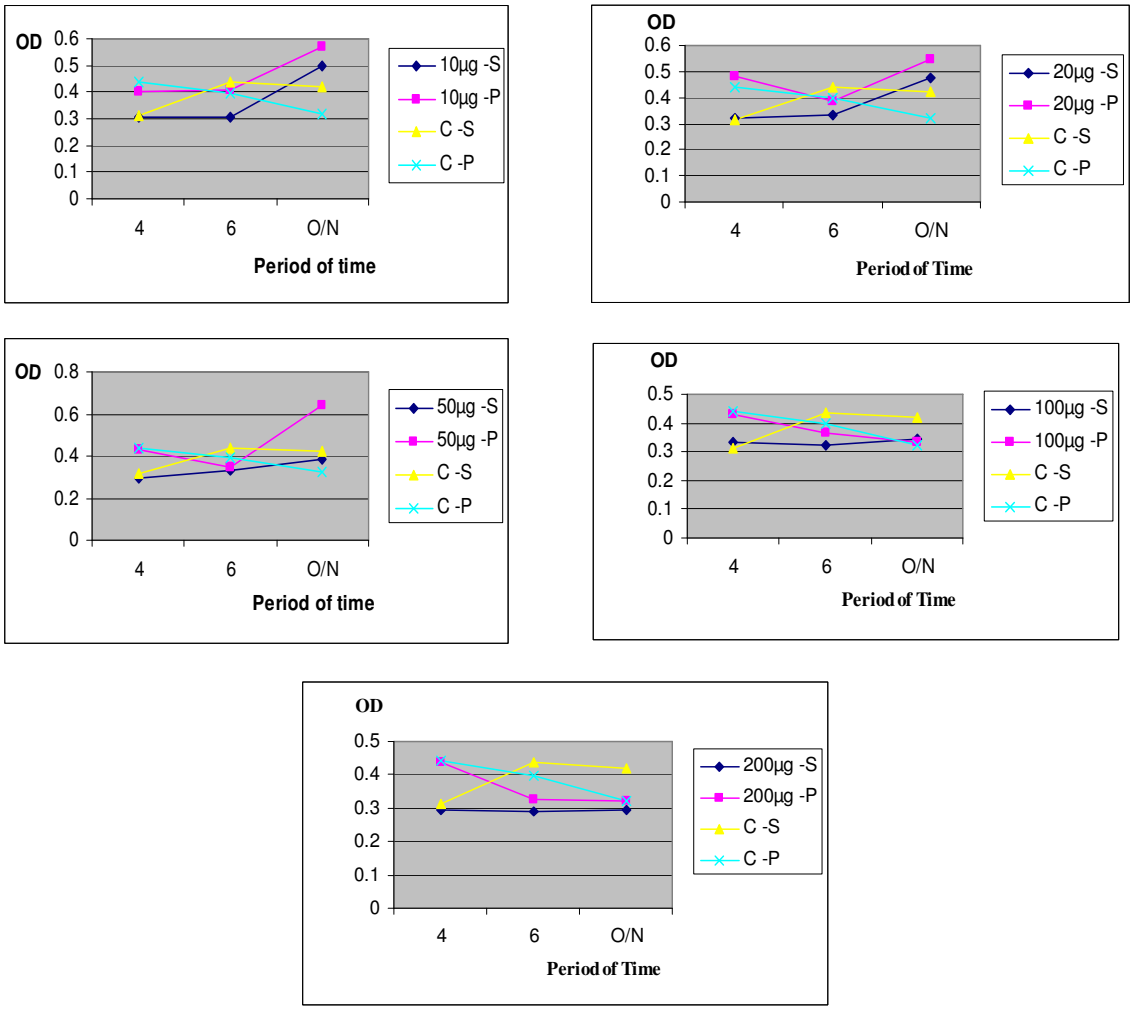
جهت بررسی توسط کیت، رده سلولی U937 کشت داده و پس از تیمار با غلظتهای مختلف (200µg، 100، 50، 20، 10) پروتئین A1-GMCSF در زمانهای مختلف انکوباسیون (4 ساعت، 6 ساعت و یک شبانه روز)، محلول رویی و رسوب سلولها جمع آوری شده و ادامه مراحل بر روی آنها مطابق دستورالعمل کیت، جداگانه مورد بررسی قرار گرفت.

وجود قطعات DNA در محلول رویی و رسوب بترتیب نشان دهنده مرگ سلول بصورت نکروز و اپاپتوز می باشد

(البته در مراحل انتهایی اپاپتوز، قطعات DNA در محلول رویی نیز حضور دارند). در مرحله نهایی، میزان جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر نوری در طول موج nm 540 سنجیده شد. نتایج در نمودارهای 3 نشان داده شده است.

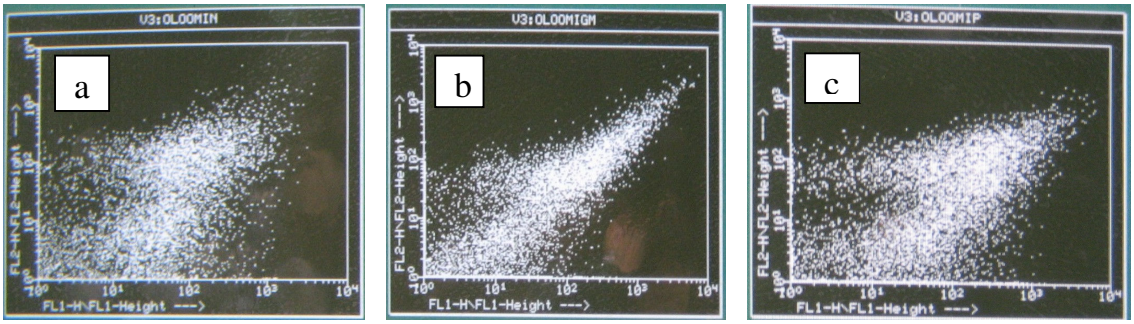


شکل 3: رنگ آمیزی سلولهای U937 (10X) a: سلولهای نرمال،b: سلولهای متاثر از 100µg از نمونه پروتئینی A1-GMCSF



نمودار 3: بررسی مکانیسم مرگ سلول توسط کیت اختصاصی الیزا

جهت بررسی فلوسایتومتریک، از رده سلولی K562 پس از تیمار با غلظت 100µg از نمونه پروتئینی، محلول رنگ شامل Annexin-V و Propidium iodide (The Phosphatidyle Serine Detection kit, IQ)؛ سپس سلولها توسط دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شد. Annexin-V متصل به فسفاتیدیل سرین در لایه خارجی غشا سلولهای اپاپتوزی می شود درصورتی که Propidium iodide به DNA سلولهای نکروز شده اتصال پیدا کرده، آنها را رنگ می نماید(14). این مسئله، اجازه تشخیص و تمیز سلولهای سالم (رنگ نشده با هیچیک از دو رنگ فلورسانت) از سلولهای اپاپتوزی (رنگ شده با Annexin-V) و سلولهای نکروزی (رنگ شده با Propidium iodide) را توسط دستگاه فلوسایتومتر فراهم می نماید.



نمودار 4: بررسی مکانیسم مرگ سلول توسط سنجش فلوسایتومتری a: کنترل منفی b: نمونه پروتئین هیبرید c: کنترل مثبت

بحث

تاکنون فیوژن توکسینهای بسیاری سنتز شده که توکسینهای مختلف گیاهی و باکتریایی بعنوان بخش سیتوتوکسیک به لیگاندهای سلولهای بیمار متصل شده اند. از آن جمله فیوژن توکسین A1-GMCSF بوده که در آن A1 ، بخش سیتوتوکسیک و GMCSF ، لیگاند متصل شده به آن می باشد.

همچنین طبق مطالعات انجام شده، گیرندهGMCSF در سطح بسیاری از سلولهای ترنسفرم شده از جمله سلولهای سرطانی خون بیان گردیده که این مسئله نشانگر این است که GMCSF می تواند یک ملکول هدف مناسب برای توکسین های نوترکیب جهت از بین بردن سلولهای سرطانی باشد. مطالعات مشابه ای که گیرنده GMCSF را هدف قرار داده اند، پیش از این صورت گرفته و منجر به ساخت فیوژن توکسینهای RT-GMCSF ، PE-GMCSF و DT-GMCSF شده است. از این میان، تحقیقات مربوط به DT-GMCSF وارد فاز کلینیکی شده است.

پلاسمید pBAD دارای پروموتور القایی آرابینوز (*ara*BAD) می باشد. سویه TOP10، میزبانی است که فاقد ژن مربوط به پروموتور آرابینوز بوده، همچنین، ژن تنظیم کننده این پروموتور یعنی *araC* نیز حذف گردیده است و کنترل بیان ژن کلون شده فقط در اختیار پلاسمید می باشد، لذا این سویه می تواند میزبان مناسبی برای پلاسمید pBAD و بیان پروتئین نوترکیب محسوب گردد. همچنین پلاسمید pBAD دارای سیگنال ترشحی gene III جهت هدایت پروتئین به فضای پری پلاسمیک بوده بنابراین پروتئین نوترکیب ساخته شده وارد فضای پری پلاسمیک می گردد. مطالعات نشان داده که شیگا توکسین می تواند مانع سنتز پروتئین در پروکاریوتها شود. در این مطالعه، بدلیل حضور این سیگنال ابتدایی، تولید پروتئین هیبرید حاوی دومین کاتالیتیک شیگا توکسین منجر به جلوگیری از سنتز پروتئین در باکتری یا کاهش رشد نمی گردد؛ زیرا پروتئین نوترکیب بلافاصله پس از تولید در سیتوپلاسم، وارد فضای پری پلاسمیک می شود.

از آنجایی که GMCSF انسانی با GMCSF موشی واکنش متقاطع (Cross Reaction) نمی دهد، لذا در صورتی که توکسیسیتی مشاهده شود، اثر توکسیسیتی غیر اختصاصی پروتئین هیبرید محسوب می گردد.

در بررسی *In vitro* پروتئین هیبرید A1-GMCSF ، اثر سیتوتوکسیسک آن بر روی دو رده سلولی دارای گیرندهGMCSF (U937 و K562) با استفاده از سنجشهای نوترال رد و تریپان بلو مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید، پروتئین هیبرید بر روی هر دو رده سلولی، اثر سیتوتوکسیک دارد که این اثر در مورد رده سلولی U937 کمی بیشتر بود. حساسیت متغیری همچنین برای DT-GMCSF گزارش شده که در آن رده سلولی U937 ، بیش از 2 برابر حساستر از رده سلولی HL60 نسبت به توکسین فیوژن است.

اختلاف در حساسیت سلولها به توکسینهای هیبرید، می تواند بعلت تفاوت در میزان گیرنده ها و میل ترکیبی آنها، همچنین در اختلاف پروسه درون سلولی آنها در سلولهای مختلف بدلیل خصوصیات ژنتیکی خاص آن سلول باشد.

بمنظور تأیید توکسیسیتی مشاهده شده تحت تأثیر فیوژن توکسین A1-GMCSF ، مهار توکسیسیتی بررسی گردید؛ بدین منظور نیاز به بلوکه کردن یکی از مسیرهای فعالیت این پروتئین می باشد. در این مطالعه ، با بکارگیری آنتی بادی علیه A1-GMCSF و خنثی کردن اثر آن ، این هدف محقق گردید و میزان توکسیسیتی به میزان قابل توجهی مهار گردید.

این یافته منطبق با مطالعاتی بوده که از فیوژن توکسین DT-GMCSF به دست آمد . مطالعات Neutralization نشان داد که سیتو توکسیسیتی پروتئین هیبرید DT-GMCSF مستلزم اتصال GMCSF به گیرنده آن در سطح سلولها بوده، بطوریکه با بلوکه کردن آن ، توکسیسیتی پروتئین هیبرید مهار می گردد.

در انتها برای توجیه و روشنتر شدن فعالیت پروتئین هیبرید، فعالیت آپوپتوزیس آن بر روی سلولهای مورد بررسی با استفاده از کیت اختصاصی الیزا و سنجش فلوسایتومتری، مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد اثر سیتوتوکسیک ایجاد شده توسط فیوژن توکسین A1-GMCSF ، به طور عمده توأم با القا آپاپتوز است.

مثالهای زیادی از القا آپاپتوز بواسطهٔ STX (که بخش آنزیمی و کاتالیتیک آن A1 می باشد)، گزارش شده است و در مطالعات *in vivo* و *in vitro* مشخص شده که شیگاتوکسین بر اکثر رده های سلولی آپاپتوز را بهمراه دارد. بر پایه مطالعات صورت گرفته در سلولهای اپیتلیال روده، شیگاتوکسین می تواند به موجب فعالیت N–گلیکوزیدازی منجر به القا آپاپتوز گردد.

در برخی رده های سلولهای اندوتلیال انسانی نیز، آپاپتوز ناشی از Stx مشاهده شده، در این سلولها فعالیتهای پروتئولیتیک کاسپازها را در سیتوزول افزایش داده و قطعه قطعه شدن DNA و متراکم شدن کروماتین مشاهده شده است .

در سلولهای HeLa ، آپاپتوز پس از در معرض قرار گرفتن با شیگاتوکسین در مدت زمان نسبتاً کوتاهی القا گردید. حدوداً 60 درصد از سلولهای HeLa در طی 4 ساعت دچار آپاپتوز شد و انکوبه کردن سلولهای HeLa با مهارکننده های کاسپازها (پیش از مواجه کردن آنها با توکسین)، سلولها را از آپاپتوز محافظت نمود.

علی رغم مطالعات سالهای اخیر در مورد نحوه عمل شیگا توکسین در القای آپاپتوز، مکانیسم دقیق آن تاکنون بخوبی شناخته نشده است.

در مطالعات مشابه با DT-GMCSF نیز در اکثر سلولهای مورد بررسی مهار سنتز پروتئین منجر به القا آپاپتوز در آنها گردید و مشخص شد به طور واضحی میزان مهار سنتز پروتئین و آپاپتوز با یکدیگر هماهنگی دارد. در این

مطالعات پروتئین هیبرید بر روی رده های سلولیU937 ، HL60 وTHP-1 مشخص و معلوم گردید میزان فعالیت آپاپتوزیس در آنها، مشابه اختلاف سیتو توکسیسیتی در رده های سلولی گوناگون، مختلف است.

این یافته می تواند نتیجه نوید بخشی برای پروتئین نوترکیب محسوب گشته، پتانسیل ورود به مراحل جدید درمانی را داشته باشد و در آینده به عنوان یک داروی بالقوه ضد سرطان کاربرد داشته باشد.

منابع

1- Habibi Roudkenar, M. Jafari, A. Oloomi M. and Bouzari, S. (2006) Selective cytotoxicity of recombinant STXA1-GM-CSF protein in hematopoetic cancer cells. Cell Biol Toxical 22:213-9.

2- Robert J Kreitman. (1999) Immunotoxins in cancer therapy Kreitman. Current Opinion in Immunology 11:570–578.

3- Frankel, Arthur E. Ramage, J. Latimer, A. Feely, T. Delatte, S. Hall, P. Tagge, E. Kreitman,R. and Willingham,,M. (1999) High level Expression and purification of the recombinant Diphtheria Fusion Toxin DTGM for PHASE I Clinical Trials. protein Expression and purification 16, 190-201.

4- Brinkmann, U. (1996) recombinan Immunotoxins: protein engineering for cancer therapy. Mol Med Today 2: 439-446.

5- Wang H, Song S, Kou G, Li B, Zhang D, Hou S, Oian W, Dai J, Tian L, Zhao J, Guo Y. (2007) Treatment of hepatocellular carcinoma in a mouse xenograft model with an immunotoxin which is engineered to eliminate vascular leak syndrome. Cancer Immunol Immunother 56: 1775-83.

6- O' Loughlin, E.V. and Robins-Browne, R.M. (2001) Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on

eukaryotic cells. Microbes Infect. 3: 493-507.

7- Lingwood, C. (1996) Role of verotoxin receptors in phathogenesis. Trends Microbiol. 4:147-53.

8- Sandving, K. and Van Deurs, B. (2000) Entry of ricin and Shiga toxin into cells: Molecular mechanisms and medical perspectives. EMBO J. 19: 5943-5950.

9- Fantelli, K. Stephan, R. (2001) Prevalence and characteristics of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland International Journal of Food Microbiology 70: 63–69.

10- Kreitman, R.J. and Pastan, I. (1997) Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either *Pseudomonasexotoxin* or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. Blood 90: 252-259

11- Metcalf, D. (1990) The colony stimulating factors: Discovery, development, and clinical application. Cancer 65: 2185-2195

12- Park, L.S., Friend, D., Gillis, S. and Urdal, D.L. (1986) Characterization of the cell surface receptorfor granulocyte-macrophage colony-stimulatingfactors. J. Biol. Chem. 261: 4177-4183

13- Habibi Roudkenari, M. Bouzari, S. Oloomi, M. Jafari, A. Shahrokhi, N. and Shokrgozar, M. A. (2005). Expression of a Chimeric Protein Containing the Catalytic Domain of Shiga-Like Toxin and Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (hGM-CSF) in *Escherichia coli* and Its Recognition by Reciprocal Antibodies. Iranian Biomedical Journal 9: 143-148.

14- Metcalf, D. (1986) The molecular biology and functions of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood 67: 257-267.

Study of apoptotic activity of Hybrid protein (A1-GM-CSF) on the different cell lines bearing GM-CSF receptor

Oloomi M., Shariati E.S. and Bouzari S.

Molecular Biology Unit, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

One of the new approaches for targeted therapy of human disease like cancer is the use of molecules so called immunotoxins. Immunotoxins, comprised of both the cell targeting and the cell killing moieties. In the last few years a new approach for targeted therapy of human disease has been developed using cytotoxic molecules that are produced by gene fusion techniques. This class of molecules termed chimeric proteins comprises both the cell targeting and the cell killing moieties. In this investigation, the already constructed chimeric protein containing catalytic domain of Shiga-like toxin (A1) fused to human granulocyte macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene and cloned in *E. coli* was expressed by arabinose induction. The expressed protein extracted and then was analyzed for its cytotoxic activity on the cells bearing GM-CSF receptor. To elucidate the apoptotic activity of hybrid protein, the expressed protein was added to the cells and the apoptotic activity was measured by cellular DNA fragmentation ELISA kit (Roche). The results indicated that the chimeric protein was cytotoxic for the cells bearing GM-CSF receptor and it was shown that different concentration of the chimeric protein induced apoptosis on the cells measured by the kit. The overall results indicated that cytotoxic activity of the chimeric protein is specific on the cells and it can also induce apoptosis.

Keywords: Apoptosis, Cancer, Immunotoxin, GM-CSF