Archive of SID

دانشور
پزشکی

# مطالعه تنظیم بیان ژن گلیکوپروتئین C(ORF14) در ویروس واریسلا زوستر

نویسندگان: محمود فراز[1*] و دکتر مجید صادقی‌زاده[2]

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
۲. استادیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
* نویسنده مسئول: Email: farazsci2000@yahoo.com

## چکیده

**مقدمه:** ویروس واریسلا زوستر (VZV) به‌عنوان یکی از اعضای خانواده هرپس ویریده و زیرخانواده هرپس ویرینه طبقه‌بندی می‌شود. VZV عامل بیماری‌زای دو بیماری بالینی مختلف است: آبله‌مرغان (واریسلا) و زونا (زوستر). طی عفونت‌زایی، پروتئین‌های VZV در روش تنظیم شده آبشاری بیان می‌شوند. محصولات ژنی بسیار زودرس (immediate-early)، پروتئین‌هایی تنظیم‌کننده (transactivators) هستند که بیان ژن‌های زود (early) و دیر (late) را تنظیم می‌کنند. ژن‌های بسیار زودرس عبارتند از: ORFهای ۴، ۶۱، ۶۲ و ۶۳. در مورد محصول ژنی زودرس پروتئین ۲۹ که یک پروتئین باندشونده به DNA است، مشخص گردیده که بیان یک ژن دیر، یعنی ORF 67 را تنظیم می‌کند. هدف از انجام این تحقیق این بوده که توانایی یک پروموتر ژن دیر دیگر، یعنی ORF14 را در پاسخ به فعالیت تنظیمی پروتئین ۲۹ نشان دهیم.

**مواد و روش‌ها:** به این منظور پرایمرهایی برای منطقه پروموتری ژن‌های ORF ۱۴ و ۶۷ (به‌عنوان کنترل) طراحی شدند تا با PCR تکثیر گردند. سپس محصولات PCR در یک وکتور گزارشگر، حاوی ترادف کدکننده ژن Lac Z کلون گردیدند. آنگاه در آزمایش‌های بیانی موقت (transient expression assays) هر کدام از این پلاسمیدها به همراه پلاسمیدهای دیگر که حاوی ژن‌های بیان‌کننده پروتئین‌های تنظیمی بودند، به درون دودمان‌های سلولی انسانی Mewo و Huh7 و دودمان سلولی Vero (میمون) ترانسفکت شدند.

**نتایج:** با توجه به حساسیت سیستم و در نظر گرفتن کنترل مثبت به‌نظر می‌رسد بیان ژن ORF 14 در سه دودمان سلولی متفاوت است. در سلول Vero نقش پروتئین ۲۹ تا حدودی ثابت می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس واریسلا زوستر، آزمایش بیانی موقت در شیشه، گلیکوپروتئین C، گلیکوپروتئین I، تنظیم ژن

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال چهاردهم – شماره ۷۰
شهریور ۱۳۸۶

وصول: ۸۳/۸/۲۳
ارسال اصلاحات: ۸۴/۱۱/۹
دریافت اصلاحات: ۸۵/۱۱/۱
پذیرش: ۸۵/۱۲/۱

## مقدمه

ویروس واریسلا زوستر (Varicella Zoster Virus) جزء آلفا هرپس ویروس‌های انسانی است که موجب واریسلا می‌شود و عموماً به آن «آبله‌مرغان» می‌گویند. واریسلا طی عفونت اولیه توسط ویروس ایجاد می‌شود. واریسلا یک بیماری عصبی- تب‌زا است، آن هم با جوش‌های تاول مانند که بیش‌تر در کودکان دیده می‌شود. عفونت اولیه توسط VZV بسیار مسری است و اپیدمی‌هایی سالیانه در میان افراد مستعد ایجاد می‌کند. در میان آلفا هرپس ویروس‌ها، VZV منحصراً دارای گرایش خاصی نسبت به لمفوسیت‌های T است و از این طریق، ویروس به پوست گسترش می‌یابد. ویروس طی



www.SID.ir

Archive of SID



عفونت اولیه در سلول‌های گانگلیای ریشه پشتی عصب مخفی می‌شود و از نو فعال شدن آن (reactivation) باعث هرپس زوستر (Herpes zoster) می‌گردد که عموماً به آن زونا (shingles) می‌گویند [۱،۲و۳].

زونا معمولاً در افراد با سن بالاتر و بیماران با ایمنی ضعیف شده دیده می‌شود. از نو فعال شدن ویروس، ممکن است درد حاد شدیدی ایجاد کند که باعث سندروم مزمنی به نام «درد اعصاب پس هرپسی» می‌گردد.

عفونت ایجاد شده توسط VZV در میان جمعیت انسانی شایع است [۴،۵و۶].

اما در مورد سیستم بیان ژن‌ها در ویروس‌ها، همان‌طور که می‌دانید در اغلب ویروس‌ها این سیستم بیان، به‌صورت آبشاری است [۷]؛ یعنی پس از ورود DNA ویروس به میزبان و به خدمت گرفتن آن، در ابتدا تنها چند ژن مشخص بیان می‌شوند. این ژن‌ها، «بسیار زودرس» نام دارند. در بیان این ژن‌ها تنها میزبان نقش دارد. در مرحله بعد، ژن‌های دیگر ویروسی بیان می‌شوند. ژن‌هایی که به آن‌ها «اولیه» (early) می‌گوییم. این ژن‌ها معمولاً در همانندسازی ویروس نقش دارند. در بیان این ژن‌ها، علاوه بر ژن‌های بسیار زود، فاکتورهای پروتئینی میزبان نیز نقش دارند. در پایان گروه سوم ژن‌ها، یعنی «ژن‌های دیر» (late) بیان می‌شوند. محصولات این ژن‌ها معمولاً پروتئین‌های ساختاری هستند. در بیان این ژن‌ها هم علاوه بر اثر ژن‌های بسیار زودرس و ژن‌های اولیه، عوامل میزبانی نیز دخیل هستند. به همین دلیل ممکن است بیان یک ژن دیر، در سلول‌های مختلف، متفاوت باشد. در ویروس VZV ژن‌های بسیار زودرس عبارتند از: ORFهای ۴،۱۰،۲۹،۶۱،۶۲،۶۳. این پروتئین‌ها با نشستن بر پروموتر ژن‌های مد نظر و همکاری با پروتئین‌های دیگر موجب بیان ژن می‌شوند [۸-۱۵].

اثر این ژن‌ها در بیان بسیاری از ژن‌های دیگر ویروسی نشان داده شده است. با توجه به پژوهش انجام گرفته لازم است در مورد گلیکو پروتئین‌های ویروس توضیح داده شود. VZV دارای ۸ گلیکوپروتئین ساختاری است. مانند بسیاری از ویروس‌ها این گلیکوپروتئین‌ها دارای نقش‌های متنوع هستند. مثلاً گلیکوپروتئین C که ژن کدکننده آن ORF 14 است و در این پژوهش انتخاب شده، در اتصال ویروس به غشای میزبان و ورود به سلول نقش دارد. همچنین این گلیکوپروتئین در بیماری زایی ویروس نیز نقش دارد که مکانیسم آن ناشناخته مانده است. همچنین می‌توان به گلیکوپروتئین I که ژن کدکننده آن ORF 67 است اشاره کرد که این پروتئین نیز در ورود ویروس به سلول میزبان و حتی همانندسازی آن مورد نیاز است [۱۶-۲۸].

در این پژوهش می‌خواهیم نقش تنظیمی پروتئین‌های بسیار زودرس ویروس را در بیان ژن گلیکوپروتئین C بررسی کنیم. با توجه به مطالعات انجام گرفته توسط دانشمندان دیگر معلوم گردیده پروتئین IE62 که در پوسته قرار دارد اصلی‌ترین پروتئین تنظیمی در VZV است. پروتئین‌های دیگر، مانند ۴، ۱۰، ۲۹ و ۶۱ نیز به این پروتئین در بیان ژن‌ها کمک می‌کنند. پروتئین ۶۳ دارای اثر بازدارندگی بر روی بسیاری از ژن‌ها است [۲۹-۳۳].

در این پژوهش از پروتئین‌های ۴ و ۶۲ استفاده شده است. می‌خواهیم ببینیم اثر این دو پروتئین بر بیان ژن گلیکوپروتئین C به‌چه‌صورت است. در این‌جا از مطالعه دانشمندان دیگر در مورد اثر این پروتئین‌ها بر ژن دیگری به نام گلیکوپروتئین I استفاده‌کردیم. از نظر فنی برای چنین مطالعه‌ای از تکنیک‌آزمایش‌های بیانی موقت به‌صورت in vitro (in vitro transient expression assay) استفاده می‌شود. در این تکنیک برای سنجیدن اثر یک پروتئین در بیان یک ژن دیگر، از مجاورسازی این دو کمک می‌گیریم. در عمل، پروتئین تنظیمی را در مجاور ژن مد نظر قرار داده، اثر آن را می‌سنجیم. یکی از تکنیک‌ها، این است که پروموتر ژن مد نظر را در یک پلاسمیدی کلون کنیم که در جلوی پروموتر این ژن، مثلاً یک ژن آنزیمی قرار داشته باشد، یعنی وکتور





www.SID.ir

Archive of SID



نوترکیبی داریم که در آن، پروموتر یک ژن ویروسی در پشت یک ژن دیگر مثلاً آنزیم قرار گرفته است. حال اگر پروتئین تنظیمی در بیان ژن نقش داشته باشد بر روی پروموتر ژن نشسته، باعث بیان آن می‌شود و چون در این‌جا به جای ژن اصلی ویروس، یک ژن آنزیم قرار گرفته است، پس آنزیم بیان می‌شود و حال می‌توان با اندازه‌گیری میزان آنزیم، به اثر پروتئین تنظیمی پی برد و حتی آزمایش را به‌صورت کمی انجام داد. برای انجام مطالعه، پلاسمیدهای مد نظر را به سلول یوکاریوتی انتقال می‌دهیم که به این عمل «ترانسفکشن» می‌گوییم. پلاسمیدهای کدکننده پروتئین‌های تنظیمی، بیان شده و بر روی پروموتر ژن ما خواهد نشست یا ارتباطی با بیان آن نخواهد داشت.

در سال۱۹۹۲ مطالعه‌ای درخصوص لنفوسیت‌های T انسانی در مورد چگونگی تنظیم بیان ژن‌های ویروس VZV با استفاده از این سیستم انجام گرفت. در این مطالعه از هر سه کلاس بیان ژنی (immediate early, early, late) چندین ژن انتخاب شد. دو ORF ۴ و۶۲ در VZV در نظر گرفته شدند. این ژن‌ها در وکتورهای بیانی (expression vectors) با پروموتر IE قوی HCMV (human cytomegalovirus) کلون گردیدند؛ یعنی پس از انتقال وکتورها به سلول می‌توان مطمئن شد که پروتئین‌های مد نظر به میزان زیاد بیان خواهند شد. از طرفی، پلاسمید نوترکیب دیگری ساخته شد که در آن، پروموتر ژن گلیکوپروتئین I (ORF 67) در یک وکتور گزارشگر آنزیمی کلون گردید. سپس با انجام ترانسفکشن در دودمان انسانی T cell این نتایج به‌دست آمد. محصول ژنی ORF 62 مهم‌ترین پروتئین تنظیمی در VZV بوده، قادر است پروموترهای هر سه کلاس ژنی را فعال سازد و محصولات ژنی ORF 4 و ORF 29 نیز به پروتئین 62 در این مورد کمک می‌کنند [۳۴].

پس از طراحی پرایمر برای بیرون کشیدن دو منطقه پروموتری ORFهای ۱۴ و ۶۷، این دو منطقه در وکتور گزارشگر آنزیمی بتا گالاکتوزیداز کلون گردیدند. از طرفی پلاسمیدهای حاوی توالی کدکننده ORFهای ۴، ۲۹ و ۶۲ که از قبل در اختیار داشتیم، در مقادیر زیاد تهیه شدند و حال عمل ترانسفکشن با ترتیبی که ذکر خواهد شد، انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

**پلاسمیدها:** در این تحقیق از پلاسمیدهای pCMV62 ,pCMV4، pMS29، pON284 و پلاسمید pSDK-Reporter Plasmid استفاده شده است. سه پلاسمید اول، حاوی ژن‌های ۶۲،۴ و ۲۹ ویروس VZV هستند که در جلو پروموتر قوی IE سایتومگالو ویروس در پلاسمید pG310 کلون شده‌اند و می‌توانند در سلول یوکاریوت بیان شوند. محصولات آن‌ها پروتئین‌های تنظیمی را کد می‌کنند که برای بیان ژن‌های دیگر لازمند. پلاسمید pON284 حاوی ژن کدکننده Lac Z در جلوی پروموتر قوی IE سایتومگالو ویروس است. از این پلاسمید به‌عنوان کنترل مثبت در آزمایش‌های ترانسفکشن استفاده شده است. از پلاسمید گزارشگر PSDK که حاوی ژن Lac Z و بدون پروموتر است؛ در این تحقیق به‌عنوان پلاسمید گزارشگر (reporter plasmid) استفاده شده است و پروموترها در این وکتور کلون می‌شوند.

PCR دو منطقه پروموتری ORF 14 و67 ORF: در ابتدا یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌ها با کمک نرم‌افزار Gene Runner طراحی شد. عدد دستیابی (accession number) توالی DNA ویروس VZV نیز از سایت NCBI به‌دست آمد (NC- 001348). ژنوم VZV دارای ۱۲۴۸۰۰ جفت باز است. طول محصول PCRها به ترتیب در مورد ORF 14 و ORF 67 ۶۵۱ و ۶۸۳ جفت باز است (شکل ۱).

در ادامه توالی سایت برش آنزیمی HindIII (5'AAGCTT 3') و PstI (5'CTGCAG 3') به‌ترتیب به سر ´۵ پرایمرهای Forward و Reverse در مورد ژن ORF 67 و به سر ´۵ پرایمرهای Reverse و Forward در مورد ژن ORF 14 اضافه گردیدند. توالی پرایمرهای Forward و Reverse به‌ترتیب برای دو منطقه پروموتری ORF 14 و ORF67 عبارتند از:

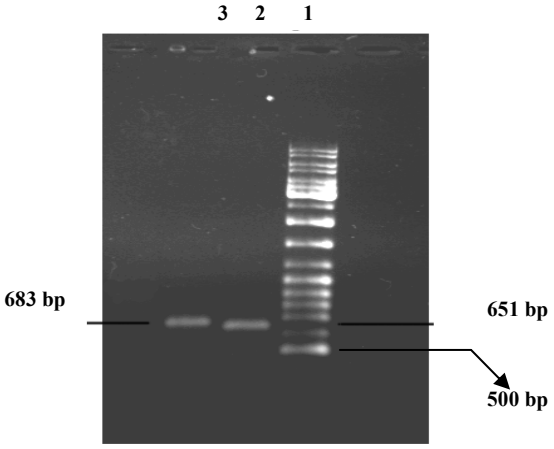




www.SID.ir

Archive of SID






**شکل ۱** ژل آگاروز ۱ درصد محصول های PCR پس از افزایش PCR Fidelity .

۱. مارکر وزنی

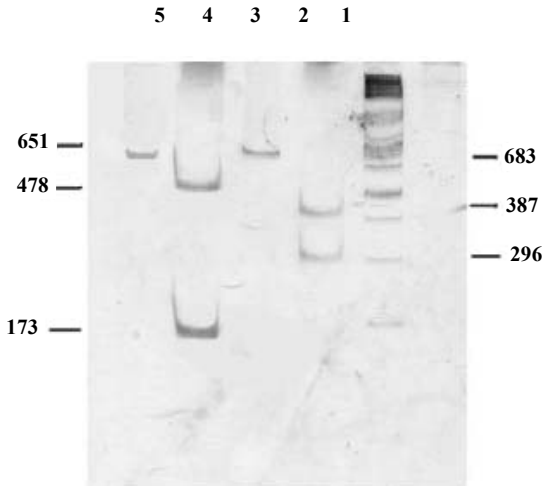
۲. محصول PCR منطقه پروموتری ژن ORF14 .

۳. محصول PCR منطقه پروموتری ژن ORF 67 .

5'TGTATCCGCTTCATCCTG3'
5'CAATTGTGACAGTGAGCGTC3'
5'GAGAGTATGTGACCATCGAG3'
5'TTGCAAGCTCACGTGGTC3'

در ادامه، محصول PCRها بر روی ژل PAGE ۶ درصد برده شد تا از تک باند بودن و Sharp بودن آن اطمینان حاصل شود. همچنین بایست محصول PCRها تأیید می‌گردیدند. بدین‌منظور محصول‌های PCR با آنزیم RsaI هضم شدند. محصول PCR منطقه پروموتری ژن ORF 14 توسط برش با آنزیم RsaI دو قطعه به اندازه‌های ۱۷۳ و ۴۷۸ جفت باز و محصول PCR منطقه پروموتری ژن ORF 67 دو قطعه به اندازه‌های ۲۹۶ و ۳۸۷ جفت باز می‌دهد. سپس محصول هضم آنزیمی به روی ژل PAGE ۶ درصد برده شد(شکل ۲).

کلون کردن محصولات PCR در وکتور گزارشگر: پس از تأیید محصولات PCR توسط برش با آنزیم محدودگر Rsa I این دو قطعه در وکتور گزارشگر کلون گردیدند. شکل زیر تأیید کلون‌های نوترکیب را توسط برش با آنزیم‌های HindIII و PstI نشان می‌دهد.




**شکل ۲** ژل PAGE ۶ درصد محصول های PCR و هضم آن‌ها با آنزیم RsaI .

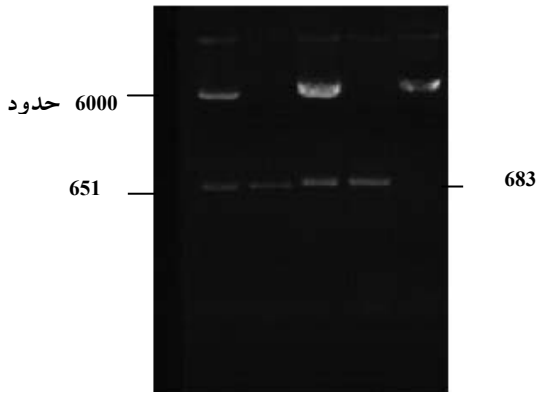
۱. مارکر وزنی

۲. محصول هضم باند PCR گلیکوپروتئین I

۳. محصول PCR گلیکوپروتئینI

۴. محصول هضم باند PCR گلیکوپروتئینC

۵. محصول PCR گلیکوپروتئینC




**شکل ۳** ژل آگاروز ۱ درصد برای تایید کلون های نوترکیب.

۱. وکتور هضم شده با دو آنزیم Hind III و PstI . (وکتور بدون Insert)

۲. محصول تخلیص‌یافته PCR گلیکوپروتئین I .

۳. هضم آنزیمی کلون گلیکوپروتئین I با دو آنزیم Hind III و PstI .

۴. محصول تخلیص‌یافته PCR گلیکوپروتئین C .

۵. هضم آنزیمی کلون گلیکوپروتئین C با دو آنزیم Hind III و PstI .





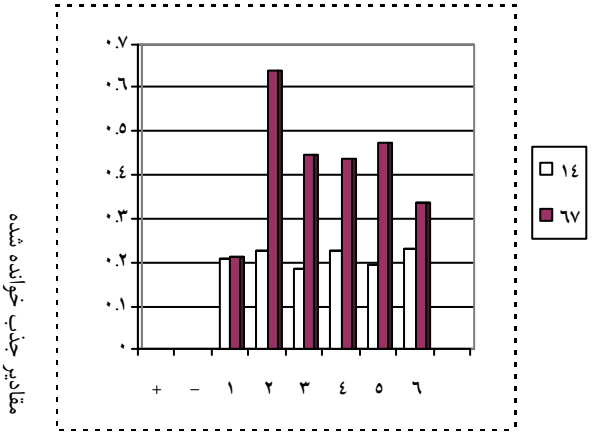
www.SID.ir

Archive of SID



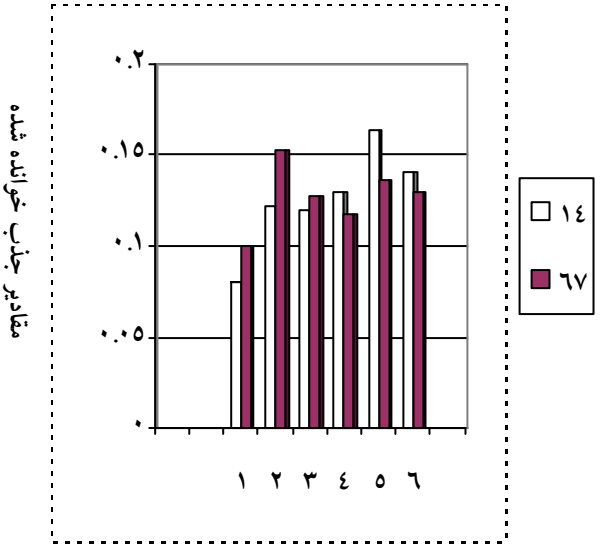
**ترانسفکشن سلول‌ها:** در ادامه، عمل ترانسفکشن در سلول‌های Mewo، Vero و Huh7 انجام گرفت. VZV را می‌توان در دودمان‌های سلول دائمی، مانند سلول‌های Hela کشت داد. سویه خاصی از ملانومای انسانی به نام Mewo برای مطالعات آزمایشگاهی روی ویروس به کار می‌رود که در این پژوهش نیز از آن استفاده شده است. VZV می‌تواند در بعضی از سلول‌های غیرانسانی مانند سلول‌های کلیه میمون رزوس و فیبروبلاست خوکچه هندی نیز رشد کند. ویروس VZV در Mewo عفونت ایجاد کرده، این سلول به‌عنوان سلول میزبان (permissive) عمل می‌کند. Mewo سلول ترانسفورم شده (transformed) ملانوسیت انسانی است و عموماً در تحقیقات در مورد ویروس VZV به کار می‌رود. Vero سلول فیبروبلاست کلیه میمون سبز آفریقایی است و ویروس VZV نمی‌تواند در آن عفونت ایجاد کند. Huh7 هم سلول هپاتوسیت انسانی است و ویروس VZV قادر به ایجاد عفونت در آن نیست، اما در تحقیقات در مورد ویروس VZV به کار می‌روند. ممکن است علاوه بر پروتئین‌های تنظیمی خود ویروس، فاکتورهای موجود در سلول‌های میزبانی نیز در بیان ژن‌ها نقش داشته باشند و انتخاب این سه سلول هم بر همین اساس بوده است. پس از در آوردن سلول‌ها از فریز و انتقال آن‌ها به فلاسک‌های کشت سلول حاوی محیط کشت، سلول‌ها رشد کرده، سپس پاساژ داده شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلول با غلظت ۱۰۰ هزار تا ۴۰۰ هزار در میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و سپس عمل ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات در مورد آن‌ها انجام گرفت.

**آنالیز بتا گالاکتوزیداز (β–gal Assay):** در آنالیز بتاگالاکتوزیداز (β–gal Assay)، از سوپرناتانت مقدار ۶۰ میکرولیتر برداشته شد. در پایان پس از تولید رنگ زرد با کمک اسپکتروفوتومتر جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر خوانده شد.




۱. پلاسمید ۱۴ و ۶۷
۲. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲
۳. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴
۴. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱ میکروگرم افزوده شده است.
۵. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۵ میکروگرم افزوده شده است.
۶. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱۰ میکروگرم افزوده شده است.

**نمودار ۱** نتایج ترانسفکشن در سلول Mewo




۱. پلاسمید ۱۴ و ۶۷
۲. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲
۳. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴
۴. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱ میکروگرم افزوده شده است.
۵. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۵ میکروگرم افزوده شده است.
۶. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱۰ میکروگرم افزوده شده است.

**نمودار ۲** نتایج ترانسفکشن در سلول Vero

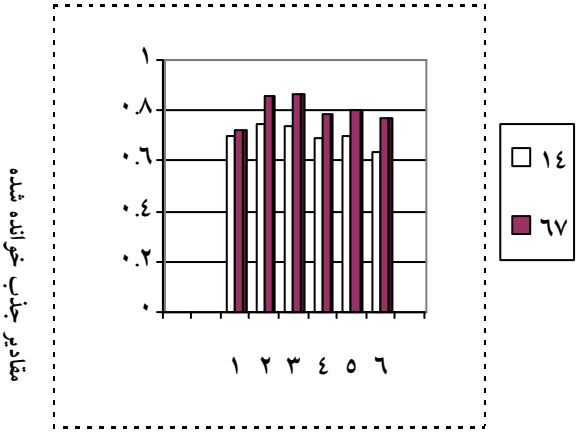




www.SID.ir

Archive of SID






۱. پلاسمید ۱۴ و ۶۷
۲ پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲
۳. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴
۴. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱ میکروگرم افزوده شده است.
۵. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۵ میکروگرم افزوده شده است.
۶. پلاسمید ۱۴ و ۶۷ به اضافه ۶۲ و۴ و ۲۹ که پلاسمید ۲۹ به میزان ۱۰ میکروگرم افزوده شده است.

**نمودار ۳** نتایج ترانسفکشن در سلول Huh7

## نتایج

نتایج کار در ترانسفکشن سلول‌های Vero،Mewo و Huh7 در نمودار ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

در نمودارهای بالا، ستون شماره ۱ پلاسمید ۱۴ و ۶۷ تنها را نشان می‌دهد. رنگ سیاه مربوط به پلاسمید ۶۷ و رنگ سفید مربوط به پلاسمید ۱۴ است. به‌ترتیب از ستون شماره ۲ تا ۶ پلاسمیدهای ۶۲، ۴-۶۲، ۴-۶۲-۲۹ (۱ میکروگرم)، ۴-۶۲-۲۹ (۵ میکروگرم) و ۴-۶۲-۲۹ (۱۰میکروگرم) اضافه شده‌اند. در شکل‌های بالا سوپرناتانت ۶۰ میکرولیتری استفاده شده است. محور عمودی میزان OD خوانده شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر را نشان می‌دهد.

می‌توان به‌طور خلاصه این طور نتیجه‌گیری کرد: در سلول Mewo نقش پروتئین‌های تنظیمی بر بیان ژن ۱۴ ثابت نمی‌شود. در سلول Vero نقش پروتئین ۶۲ و همکاری پروتئین‌های دیگر اثبات می‌گردد. پروتئین ۲۹ با میزان ۵ میکروگرم به‌نظر نقش فعال‌کنندگی دارد. در سلول Huh7 با توجه به نمودار پروتئین ۶۷ به‌نظر می‌رسد پروتئین‌های تنظیمی نقش فعال‌کنندگی زیادی ندارند.

زمانی که پروتئین ۶۲ نقش فعال کنندگی نداشته باشد، پروتئین‌های دیگر، اثری بر بیان ژن ۱۴ نیز ندارند و زمانی ایفای نقش می‌کنند که در ابتدا پروتئین ۶۲ نقش داشته باشد و حال این پروتئین‌ها در حضور پروتئین ۶۲ مؤثر است.

## بحث

هدف ما از انجام این بررسی این بود که ببینیم نحوه تنظیم بیان ژن ۱۴ در ویروس VZV به چه صورت است و آیا مثلاً پروتئین ۲۹ که در مورد ژن دیگر ویروسی یعنی ۶۷ نقش دارد در این‌جا نیز نقش ایفا می‌کند؟ ORF29 که جزء محصولات Early (همانند سازی) ویروسی، و یک پروتئین باند شونده به DNA است به‌عنوان یک پروتئین تنظیمی در تنظیم بیان یکی از ژن‌های Late، یعنی گلیکوپروتئین I نقش ایفا می‌کند. این پروتئین به کمک دیگر پروتئین‌های تنظیمی، یعنی پروتئین ۶۲ و پروتئین ۴ عمل خود را انجام می‌دهد و در حقیقت به‌عنوان یک تعدیل‌کننده (modulator) عمل می‌کند و اثر پروتئین ۶۲ را افزایش می‌دهد. در این‌جا ژن دیگری به نام ژن گلیکوپروتئین C (ORF 14) انتخاب گردید. این پروتئین نقش مهمی در عفونت‌زایی ویروس دارد و چگونگی تنظیم بیان این ژن مهم، هنوز مشخص نشده و در هاله‌ای از ابهام قرار دارد. فرضیه ما این بوده که احتمالاً پروتئین ORF29 به‌عنوان یک پروتئین تنظیمی در تنظیم بیان ژن گلیکوپروتئین C نقش ایفا می‌کند. برای اثبات این فرضیه از روش آزمایش تنظیم پروموتر در سلول‌های انسانی با استفاده از ژن گزارشگر بتا گالاکتوزیداز در حضور پلاسمیدهای نوترکیب، حاوی ژن‌های تنظیمی ویروس VZV و ژن ORF 29 به‌عنوان ژن تنظیم‌کننده (modulator)، در سیستم بیانی موقت (In Vitro Transient Expression Assay) استفاده گردیده است.

همان‌گونه که در مقدمه اشاره کردیم از نمونه ۶۷ به‌عنوان کنترل استفاده شد. آزمایش‌های دانشمندان دیگر نشان داده بود که پروتئین ۶۲ در بیان ژن ۶۷ نقش دارد و پروتئین‌های ۴ و ۲۹ هم به آن کمک می‌کنند. پس انتظار داریم با افزودن این دو بیان افزایش یابد.





www.SID.ir

Archive of SID



چرا در نمودارهای ما در پاره‌ای مواقع این افزایش مشاهده نمی‌شود؟ دلیل اصلی این است که با افزایش تعداد و مقدار پلاسمیدها از کارایی انتقال پلاسمیدها به درون سلول یوکاریوت کاسته می‌شود. پس می‌توان نمودارها را با در نظر گرفتن این موضوع تفسیر کرد. آنچه برای ما اهمیت دارد این است که ما در حقیقت، اساس فرضیه خود را بر مقایسه با ژن کنترل قرار داده‌ایم. هر اتفاق روی ژن ۱۴ بیفتد طبیعتاً در مورد ژن ۶۷ نیز رخ می‌دهد. پس ما با مقایسه نمودارها می‌توانیم نتایج را تفسیر کنیم. در حقیقت در این‌جا از آمار استفاده نمی‌کنیم بلکه تنها قیاس بین دو آزمایش که با هم و در یک زمان و در شرایط یکسان انجام می‌گیرند، نتیجه لازم را به ما می‌دهد. در ترانسفکشن باید اشاره کرد که وجود پلاسمید کنترل، یعنی pON284 اهمیت دارد. در نمودارهای ذکر شده این پلاسمید نشان داده نشده است. این پلاسمید حاوی پروموتر قوی HCMV است. در انجام آزمایش ترانسفکشن (Transfection) اطمینان از انتقال پلاسمیدها به درون سلول الزامی است، بخصوص از آن‌رو که برخی از سلول‌ها نسبت به عمل ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات به‌خوبی جواب نمی‌دهند. در آزمایش بتا گالاکتوزیداز، سلول تنها (سلولی که ترانسفکت نشده است) نیز به‌عنوان کنترل منفی لیز می‌گردد. حال با در نظر گرفتن این مورد می‌توان قضاوت درستی درباره نمونه‌ها به‌عمل آورد. در آزمایش ما، سلول تنها هم دارای جذب بود. در این‌جا چندین عامل تأثیرگذار است. امکان دارد رنگ تولید شده در اثر تجزیه سوبسترا به‌وسیله آنزیم‌های درون سلول یوکاریوت باشد. این موضوع از معایب سیستم گزارشگری آنزیمی بتا گالاکتوزیداز محسوب می‌شود. البته ممکن است خود سوبسترا هم در اثر گذشت زمان تجزیه گردد. این امر خصوصاً زمانی که زمان انکوباسیون افزایش یابد، نمود بیش‌تری می‌یابد. پس از ترانسفکشن پلاسمیدهای نوترکیب تنها، آن‌ها هم دارای جذب بودند. در این‌جا ممکن است خود پروموتر تنها، فعالیت داشته باشد و یا در اثر وجود پروموترهای دیگرکه در وکتور قرار دارند رونویسی در مورد آن صورت گیرد. برای جلوگیری از این امر، توالی Poly A به انتهای ژن گزارشگر و همین طور قبل از توالی پروموتری می‌افزایند. پلاسمید گزارشگر استفاده شده در این تحقیق، تنها حاوی توالی Poly A در انتهای ژن گزارشگر است.

در مورد سیستم به کار رفته در آزمایش انجام گرفته باید به چندین نکته اشاره شود. این پژوهش با توجه به امکانات موجود در ایران انجام گرفته و نمی‌توانستیم از روش دیگری استفاده کنیم، چون ما نیاز به آنالیز کمّی داشتیم و نه کیفی. اگر آنالیز کیفی بود آزمایش راحت‌تر صورت می‌گرفت و می‌توانستیم مثلاً از GFP استفاده کنیم که این پلاسمید وجود داشته و با میکروسکوپ فلورسان می‌توانستیم به راحتی آن را تشخیص دهیم.

با افزایش تعداد پلاسمیدها از کارایی ترانسفکشن کاسته می‌شود. نکته اساسی این است که باید در زمان ترانسفکشن، کلیه شرایط برای ول‌های مختلف یکسان باشد؛ چه در غیر این‌صورت، جواب‌های مناسبی به‌دست نمی‌آید. آنچه از مطالعه صورت گرفته بر می‌آید این است که باید از DNA حامل (DNA Carrier) هم استفاده کرد، به‌طوری که در تمام ول‌های ظرف ترانسفکشن مقدار DNA پلاسمیدی یکسان باشد. در مقایسه اعداد به‌دست آمده از ترانسفکشن سه نوع سلول مختلف ترانسفکت شده باید با احتیاط عمل شود؛ چرا که ممکن است تفاوت‌ها مربوط به کارایی متفاوت ترانسفکشن با روش کلسیم فسفات باشد، زیرا هر سلول کارایی ترانسفکشن خاصی دارد. به‌نظر می‌رسد بیان ژن گلیکوپروتئین ۱۴ در سه دودمان سلولی متفاوت است. پروموتر ژن گلیکوپروتئین ۱۴ نسبت به پروموتر ژن گلیکوپروتئین ۶۷ ضعیف‌تر بوده، در مقایسه با آن نسبت به پروتئین‌های تنظیمی مشترک، پاسخ ضعیف‌تری می‌دهد. تاکنون اثر پروتئین ۶۲ را به تنهایی، در بیان ژن گلیکوپروتئین ۱۴ نشان نداده‌اند، ولی به‌نظر می‌رسد در این‌جا در سلول Huh7 نقش داشته باشد که البته میزان آن زیاد قابل توجه نبوده است. نکته مهم دیگر این است که باید آزمایش‌های تأییدی برای اطمینان کامل از نحوه بیان ژن ۱۴ صورت گیرد.





www.SID.ir

Archive of SID



## منابع


1. Arvin, A. M. 2001. Varicella-zoster virus, p. 2731–2767. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
2. Sommer, M. H., E. Zagha, O. K. Serrano, et al. 2001. Mutational analysis of the repeated open reading frames, ORFs 63 and 70 and ORFs 64 and 69, of varicella-zoster virus. J. Virol. 75:8224–8239.
3. Roizman B, Barta A, Biggs PM, et al. Provisional labels for herpesviruses. J Gen Virol, 1973;20:417 - 419.
4. Sophie Hambleton and Anne A. Gershon*2005 LINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Jan. 2005, p. 70–80
5. Weller, T. H. 1983. Varicella and herpes zoster: changing concepts of the natural history, control, and importance of a not-so-benign virus. N. Engl. J. Med. 309:1362–1368, 1434–1440.
6. Weller, T. H. 1996. Varicella: historical perspective and clinical overview. J. Infect. Dis. 174:S306–S309.
7. Ruyechan, W., P. Ling, P. Kinchington, and J. Hay. 1991. The correlation between varicella zoster virus transcription and the sequence of the viral genome, p. 45.
8. Perera, L. P., J. D. Mosca, M. Sadeghi-Zadeh, W. T. Ruyechan, and J. Hay. 1992. The varicella-zoster virus immediate early protein, IE62, can positively regulate its cognate promoter. Virology 191:346–354.
9. Moriuchi, H., M. Moriuchi, and J. I. Cohen. 1995. Proteins and cis-acting elements associated with transactivation of the varicella-zoster virus (VZV) immediate-early gene 62 promoter by VZV open reading frame 10 protein. J. Virol. 69:4693–4701.
10. Meier, J., and S. Straus. 1992. Comparative biology of latent varicellazoster virus and herpes simplex virus infections. J. Infect. Dis. 166:S24–S29.
11. Mahalingham, R., M. Wellish, R. Cohrs, S. Debrus, J. Piette, B. Rentier, and D. H. Gilden. 1996. Expression of protein encoded by varicella-zoster virus open reading frame 63 in latently infected human ganglionic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2122–2124.
12. Lungu, O., P. Annunziato, A. Gershon, S. Stegatis, D. Josefson, P. La-Russa, and S. Silverstein. 1995. Reactivated and latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10980–10984.
13. Kennedy, P., E. Grinfeld, and J. W. Gow. 1999. Latent varicella-zoster virus in human dorsal root ganglia. Virology 258:451–454.
14. Kennedy, P. G. E., E. Grinfeld, and J. E. Bell. 2000. Varicella-zoster virus gene expression in latently infected and explanted human ganglia. J. Virol. 74:11893–11898.
15. Donahue, J. G., P. W. Choo, J. E. Manson, and R. Platt. 1995. The incidence of herpes zoster. Arch. Intern. Med. 155:1605–1609.
16. Ling, P., P. R. Kinchington, M. Sadeghi-Zadeh, W. T. Ruyechan, and J. Hay. 1992. Transcription from varicella-zoster virus gene 67 (glycoprotein IV). J. Virol. 66:3690–3698.
17. Kinchington, P. R., J. K. Hougland, A. M. Arvin, W. T. Ruyechan, and J. Hay. 1992. The varicella zoster virus immediate-early protein IE62 is a major component of virus particles. J. Virol. 66:359–366.
18. Kinchington, P. R., D. Bookey, and S. E. Turse. 1995. The transcriptional regulatory proteins encoded by varicella-zoster virus open reading frames (ORFs) 4 and 63, but not ORF 61, are associated with purified virus particles. J. Virol. 69:4274–4282.
19. Ito, H., M. H. Sommer, L. Zerboni, H. He, J. Hay, W. Ruyechan, and A. M. Arvin. 2003. Promoter sequences of varicella-zoster virus glycoprotein I targeted by cellular tranactivating factors Sp1 and USF determine virulence in skin and T cells in SCIDhu mouse in vivo. J. Virol. 77:489–498.
20. Gershon, M. D., and A. A. Gershon. 1999. Role of glycoproteins in varicella-zoster virus infection. Contrib. Microbiol. 3:43–60.
21. Cole, N. L., and C. Grose. 2003. Membrane fusion mediated by herpesvirus glycoproteins: the paradigm of varicella zoster virus. Rev. Med. Virol. 13: 207–222.
22. Mallory, S., M. Sommer, and A. M. Arvin. 1997. Mutational analysis of the role of glycoprotein I in varicella-zoster virus replication and its effects on glycoprotein conformation and trafficking. J. Virol. 71:8279–8288.
23. Mo, C., J. Lee, M. Sommer, C. Grose, and A. M. Arvin. 2002. The requirement of varicella-zoster virus glycoprotein E for viral replication and the effects of glycoprotein I on gE in melanoma cells. Virology 304:176–186.
24. Moffat, J., C. Mo, J. J. Cheng, M. Sommer, L. Zerboni, S. Stamatis, and A. M. Arvin. 2004. Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T-cell tropism in vivo. J. Virol. 78:12406–12415.
25. Moffat, J., M. Sommer, S. Taylor, S. Mallory, and A. M. Arvin. 2002. VZV glycoprotein I is required for viral replication in skin and T cells. J. Virol. 76:8468–8471.
26. Perera, L. P., J. D. Mosca, W. T. Ruyechan, and J. Hay. 1992. Regulation of varicella-zoster virus gene expression in human T lymphocytes. J. Virol. 66:5298–5304.
27. Wang, Z., M. D. Gershon, O. Lungu, C. A. Panagiotidis, Z. Zhu, Y. Hao, and A. A. Gershon. 1998. Intracellular transport of varicella-zoster glycoproteins. J. Infect. Dis. 178(Suppl. 1):S7–S12.
28. Wang, Z. H., M. D. Gershon, O. Lungu, Z. Zhu, S. Mallory, A. M. Arvin, and A. A. Gershon. 2001. Essential role played by the C-terminal domain of glycoprotein I in envelopment of varicella-zoster virus in the trans-Golgi network: interactions of glycoproteins with tegument. J. Virol. 75:323–340.
29. Ng, T. I., L. Keenan, P. R. Kinchington, and C. Grose. 1994. Phosphorylation of varicella-zoster virus open reading frame (ORF) 62 regulatory product by viral ORF 47-associated protein kinase. J. Virol. 68:1350–1359.
30. Kinchington, P. R., and S. E. Turse. 1998. Regulated nuclear localization of the varicella zoster virus major regulatory protein IE62. J. Infect. Dis. 178: S16–S21.
31. Kinchington, P. R., and J. I. Cohen. 2000. Varicella zoster virus proteins, p. 74–104. In A. M. Arvin and A. A. Gershon (ed.), Varicella zoster virus. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
32. Inchauspe, G., S. Nagpal, and J. M. Ostrove. 1989. Mapping of two varicella-zoster virus-encoded genes that activate the expression of viral early and late genes. Virology 173:700–709.
33. Chen, J., A. Gershon, S. J. Silverstein, Z. S. Li, O. Lungu, and M. D. Gershon. 2003. Latent and lytic infection of isolated guinea pig enteric and dorsal root ganglia by varicella zoster virus. J. Med. Virol. 70:S71–S78.
34. Perera LP, Mosca JD, Ruyechan WT, Hay J. Regulation of Varicella zoster Virus gene expression in human T lymphocytes. J Virol, 1992; 66:5298-5304.






www.SID.ir