Archive of SID

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
شمارهٔ ۶۳ (پاییز۱۳۸۳)، صفحات ۱۹- ۱۶

مطالعه کنش جدید بین پروتئین کنترل کننده چرخه سلولی و سایر پروتئین های سلولی

دکتر مرتضی جبارپور بنیادی: استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز ـ مرکز تحقیقات کاربردی دارویی: نویسنده رابط
bonyadim@tbzmed.ac.ir

دکتر ژان داربون: استادیار ژنتیک دانشگاه پل ساباتیه تولوز فرانسه

دریافت: ۸۲/۱۰/۹ ، بازنگری: ۸۲/۵/۳، پذیرش: ۸۳/۵/۱۴

چکیده

زمینه و اهداف: پروتئین کنترل کننده چرخه سلولی (Chk_2) نقش اساسی در کنترل چرخه سلولی در موارد شکستگی مولکول DNA به عهده دارد. این پروتئین در صورت بروز شکستگی در مولکول DNA توسط یکسری از پروتئین های دیگر فسفریله و فعال می شود. پروتئین فعال شده Chk_2 باعث توقف چرخه سلولی در فاز G_2 می شود. این پروتئین به همراه پروتئین های دیگر باعث فعال شدن سیستم ترمیم DNA و در مواردی باعث شروع مرگ برنامه ریزی شده سلولی[1] می شود. آگاهی از پروتئین هایی که با این پروتئین کنش نشان می دهند و به نحوی در کنترل چرخه سلولی و فرآیند های مذکور به طور مستقیم یا غیرمستقیم دخالت دارند، حایز اهمیت است. نقص و جهش در هریک از این پروتئین ها منجر به نقص در سیستم های فوق الذکر وقوع بیماریهایی نظیر سرطان می شود.

روش بررسی: با استفاده از سیستم هیبریداسیون مخمری پروتئین هایی که با پروتئین Chk_2 کنش نشان می دهند، مورد بررسی قرار گرفتند. بانک cDNA استخراج شده از ناف نوزاد انسان به عنوان منبع cDNA کد کننده پروتئین و cDNA کد کننده پروتئین Chk_2 انسانی به عنوان طعمه مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: پروتئین PP_2A با پروتئین Chk_2 در سیتسم مخمری کنش قوی نشان داد. این کنش بعد از چندین بار تکرار در سیستم مذکور مورد تأیید کامل قرار گرفت.

نتیجه گیری: کنش پروتئین PP_2A با پروتئین Chk_2 دخالت مستقیم یا غیر مستقیم این پروتئین در بروز سرطان را نشان می دهد. اثبات این دخالت مستلزم تحقیقات بیشتر بر روی توالی ژنی کد کننده PP_2A در سرطان های نوع خانوادگی است.

کلید واژه ها: Chk_2 ، سرطان، چرخه سلولی، PP_2A ، سیستم هیبریداسیون مخمری

مقدمه

سلولهای سرطانی از جنبه های متعددی به سلولهای طبیعی شباهت دارند. در این سلولها معمولاً یک یا چند عملکرد اساسی سلولی از کنترل طبیعی خارج می شود. این عملکردها به طور عموم به چهار طبقه فرآیند چرخه سلولی، فرآیند تمایز سلولی، سیستم ترمیم DNAو فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلولی تقسیم می شوند(۱).

بافت هایی که بنا به دلایل مختلف توان کنترل و بازدارندگی آنها در چرخه سلولی مختل شده باشد سرطانی می شوند. عوامل داخلی و خارجی متعددی در کنترل فرآیند چرخه سلولی نقش دارند. از عوامل خارجی که نقش مهمی در کنترل چرخه سلولی به عهده دارند می توان به عوامل رشد، دانسیته سلولی و مواد غذایی موجود برای رشد و نمو سلولها اشاره کرد. این عوامل به طرق مختلف بر رویCDK[2] ها تأثیر می کنند و اثر تحریکی یا بازدارندگی خود را بر روی چرخه سلولی اعمال می نمایند. بنابراین کنترل فعالیت CDKها برای کنترل چرخه سلولی ضرورت دارد. این کنترل در سطوح و مراحل مختلف صورت می پذیرد که عبارتند از کنترل سنتز CDKها، تنظیم بعد از ترجمه نظیر فسفریله و دفسفریله شدن و در نهایت، سرعت تجزیه این پروتئین ها(۱).

چرخه سلولی در سلولهای طبیعی به محض بروز شکستگی در رشته های DNA متوقف می شود و تا ترمیم کامل DNA صدمه دیده اجازه ادامه و ورود به مرحله بعدی چرخه داده نمی شود. در مواردی به دلیل فاحش بودن نوع شکستگی در کروموزوم و عدم امکان ترمیم آن، سلول وارد فرآیند دیگری به نام مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شود(۲).

پروتئین های متعددی از زمان وقوع شکستگی در مولکول DNA تا توقف کامل چرخه سلولی و ترمیم مولکول صدمه دیده DNA و در صورت ترمیم کامل آن، شروع دوباره چرخه دخالت فعال دارند. مکانیسم عملکرد این پروتئین ها بسیار پیچیده است ولی به اختصار توضیح داده می شود.

به محض بروز شکستگی در مولکول DNA یکسری پروتئین ها از جمله پروتئین های خانواده Rad و سیگنال لازم را ارسال می کنند. این سیگنال با استفاده از پروتئین های مختلف به پروتئین ATM[3] منتقل و باعث تحریک این پروتئین می شود(۳). پروتئین تحریک یافته ATM سیگنال مزبور را به پروتئین های مختلف از جمله BRCA۱ (٤)، P۵۳ (۵) و Chk۲ منتقل می سازد. این پروتئین ها به محض دریافت سیگنال، به کمک همدیگر چرخه سلولی را متوقف می سازند. با توقف چرخه سلولی، سیستم ترمیم DNA توسط یکسری پروتئین های دیگر فعال می شود تا DNA آسیب دیده ترمیم شود. در صورتی که شکستگی در مولکول DNA غیرقابل ترمیم باشد، فرآیند آپوپتوز در سلول فعال

1. Apoptosis
2. Cyclin Dependent Kinase
3. Ataxia Telangiectasia Mutated

www.SID.ir

Archive of SID

می شود تا سلول صدمه دیده از چرخه سلولی حذف شود. بدین صورت فرآیند های مذکور مانع انتقال مولکول صدمه دیده DNA به نسل های آینده سلولی می شود. جهش در هریک از پروتئین های دخیل این فرآیند ها منجر به بروز بیماریهای متعددی نظیر سرطان میگردد؛ برای مثال، جهش در ژن BRCA۱ در اکثر سرطان های سینه در زنان دیده می شود(٤). مشاهدات بیانگر این بوده که در ۵۰ درصد از انواع مختلف سرطانهای مطالعه شده، ژن P۵۳ متحمل جهش شده است(۵).

به محض بروز شکستگی در DNA سیگنال ایجاد شده از ATM به Chk۲ منتقل و منجر به فسفریله شدن این پروتئین و فعال شدن آن می شود. پروتئین تحریک یافته Chk۲ نیز خود سیگنال دریافتی را به پروتئین های دیگر نظیر Cdc۲۵C انتقال می دهد. فرآیند نهایی انتقال این سیگنال ها توقف چرخه سلولی در فاز G۲ است(٦).

در این تحقیق جهت پیدا کردن پروتئین هایی که با پروتئین Chk۲ در ارتباط و کنش مستقیم هستند و در انتقال سیگنال ها از این مسیر به انحاء مختلف دخالت دارند از سیستم هیبریداسیون مخمری استفاده شد.

مواد و روش ها

سیستم هیبریداسیون مخمری مطابق روشی که قبلاً توضیح داده شد، صورت پذیرفت(۷). مخمر نوع AH۱۰۹ در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. برای استفاده از این سیستم ابتدا cDNA از پروتئین هدف که به عنوان طعمه از آن ذکر می شود، در محیط آزمایشگاهی تهیه شد. برای دستیابی به cDNA کد کننده Chk۲ از پلاسمیدی که حاوی cDNA مورد نظر بود و قبلاً در آزمایشگاه برای اهداف دیگر تهیه شده بود، استفاده شد. این cDNA با استفاده از دو آنزیم با اثر محدود از پلاسمید ناقل خود قطع و جدا گردید. قطعه DNA حاصل از این روش تلخیص و استفاده شد. سپس این قطعه از DNA با استفاده از آنزیم لیگاز به پلاسمید مورد نیاز برای سیستم هیبریداسیون مخمری متصل گردید. این پلاسمید PAS۲ حاوی پروموتوری است که باعث می شود cDNA داخل شده در پلاسمید بیان شود. در انتهای دیگر cDNA وارد شده، قطعه ای از DNA در روی پلاسمید تعبیه شده بود که کاملاً چسبیده به این cDNA بود. بنابراین به هنگام بیان cDNA، این قطعه از DNA نیز بیان می شود و پروتئینی را کد میکند که به پروتئین کد شده توسط cDNA چسبیده باقی می ماند. این پروتئین چسبیده قسمتی از پروتئین GAL٤ را تشکیل می‌دهد. لازم به ذکر است که پروتئین کامل GAL٤ در مخمر مذکور باعث بیان ژن های خاص دیگر به نام ژن های مارکر می شود ولی این پروتئین توانایی بیان ژن های مارکر را ندارد. بعد از تهیه پلاسمید PAS۲–Chk۲ تمامی مخمرها توسط این پلاسمید تغییر شکل یافتند.

برای تغییر شکل مخمرهای AH۱۰۹ ابتدا این مخمرها در محیط کشت مایع و غنی YPD در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد کشت و تکثیر داده شدند. سپس این مخمرها با استفاده از روش شیمیایی PEG/DMSO با پلاسمید ساخته شده PAS۲–Chk۲ تغییر شکل یافتند.

پلاسمید ساخته شده PAS۲–Chk۲ حاوی توالی ژنی دیگری است که مخمر را قادر به سنتز اسید آمینه ضروری تریپتوفان می کند. برای جدایی مخمرهای تغییر یافته از مخمرهایی که دست نخورده مانده بودند، تمامی مخمر ها در محیط کشت فاقد تریپتوفان کشت داده شدند. در این محیط کشت انتخابی تنها مخمرهایی که حاوی پلاسمید مذکور بودند توانای رشد را داشته و قادر به تکثیر بودند. تعداد کثیری از مخمرهای حاوی پلاسمید مورد نظر در محیط کشت فاقد تریپتوفان کشت و برداشت شدند تا در امتداد این مطالعات مورد استفاده قرار گیرند.

در مرحله بعدی، بیان ژن Chk۲ که در درون پلاسمید PAS۲ به مخمرهای AH۱۰۹ منتقل شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت. برای اطمینان از بیان ژن مذکور، تمامی پروتئین های مخمرهای تغییر شکل یافته AH۱۰۹ استخراج و با استفاده از روش وسترن بلاتینگ وجود پروتئین Chk۲ به اثبات رسید.

مشاهده پروتئین انسانی Chk۲ در درون مخمرها بیانگر این بود که ژن انتقال داده شده قادر به بیان شدن در درون سلولهای مخمری بود. مخمرهای حاصل که حاوی پلاسمید PAS۲–Chk۲ بودند، به طریق شیمیایی ذکر شده، با بانک cDNA که از بند ناف جنین تهیه شده بود، تغییر داده شدند.

هریک از این cDNA به نحوی تهیه شده بودند که یکی از هزاران پروتئین انسانی را رمز دهی کنند. بنابراین cDNA های کد کننده تقریباً تمامی پروتئین های انسانی در درون این بانک cDNA قرار داشتند. طراحی این cDNA ها به نحوی بود که به هنگام بیان شدن و کد کردن پروتئین مخصوص خود، پروتئین دیگری را نیز چسبیده به آن کد می کردند که این پروتئین قسمت باقی مانده از پروتئین GAL٤ بود.

تغییر شکل مخمرها به نحوی اجرا شده بود که هر سلول مخمر حتی الامکان تنها حاوی یک پلاسمید از بانک cDNA مذکور باشد. بنابراین هر یک از مخمرهای به دست آمده حاوی دو پلاسمید بود. یکی از پلاسمیدها پلاسمید PAS۲–Chk۲ و پلاسمید دیگر یکی از پلاسمیدهای بانک cDNA بود.

پلاسمید دوم به علت کد کردن اسید آمینه ضروری لوسین مخمر را قادر می سازد که علاوه بر توانایی رشد در محیط کشت فاقد اسید آمینه تریپتوفان (به دلیل کد شدن این اسید آمینه توسط پلاسمید Chk۲–PAS۲) توان رشد در محیط کشت فاقد لوسین را نیز داشته باشد. در هر مخمری دو پروتئین، یکی پروتئین Chk۲ و دیگری پروتئین کد شده توسط cDNA که محصول آن پروتئینی از پروتئین های انسانی است، بیان می شد. اگر در یکی از مخمرها این دو پروتئین با همدیگر کنش نشان می دادند و کنار همدیگر قرار می گرفتند، منجر به کنار هم قرار گرفتن دو قطعه جدا از هم پروتئین GAL٤ نیز می شدند. کنارهم قرار گرفتن قطعات جدا از هم پروتئین GAL٤ و تشکیل پروتئین GAL٤ منجر به بیان ژن های مارکر در آن مخمر ویژه می شد.

در مخمرهای AH۱۰۹ ژن های مارکر ژن های کد کننده اسید آمینه های ضروری آدنین و هیستیدین هستند. بنابراین در مخمرهایی که ژن های مارکر آنها بیان شده باشد (به دلیل تشکیل پروتئین کامل GAL٤) این مخمرها قادر به رشد در محیط های کشت فاقد اسید آمینه های آدنین و هیستیدین خواهند بود.

تعداد بسیار محدودی از مخمرهای تغییر شکل یافته توسط دو پلاسمید ذکر شده، در محیط کشت فاقد آسید آمینه های تریپتوفان، لوسین، هیستیدین و آدنین قادر به رشد بودند. در این تعداد از مخمرها که ناقل پلاسمید PAS۲–Chk۲ و پلاسمید بانک cDNA بودند، کنش بین پروتئین های کد شده توسط این پلاسمیدها (پروتئین Chk۲ و پروتئین ناشناخته ای که توسط cDNA کد می‌شد) به آنها این توانایی را

www.SID.ir

Archive of SID

داده بود که در محیط کشت انتخابی مذکور رشد کنند. cDNA این پلاسمیدها که متعلق به بانک cDNA بودند، استخراج و جهت تعیین توالی cDNA به مراکز تعیین توالی ارسال شد.

توالی‌های به دست آمده با توالی ژن‌های موجود در NCBI توسط نرم افزار ویژه بلاست[1] شد تا پروتئین کد شده توسط آن cDNA شناسایی شود.

یافته ها

تعداد پروتئین هایی که در سیستم هیبریداسیون مخمری با پروتئین Chk۲ کنش داشتند ۱۴ عدد بودند. این تعداد از پروتئین ها در بار دوم غربالگری کاهش پیدا کرد. از بین پروتئین های این مرحله نیز تنها یک پروتئین انتخاب شد که ارتباط این پروتئین با پروتئین Chk۲ منطقی و قابل قبول به نظر می رسید. در انتخاب این پروتئین از بین پروتئین هایی که با Chk۲ کنش پروتئینی نشان داده بودند، یکسری از خصوصیات در نظر گرفته شده بود که برای نمونه می توان به مورد زیر اشاره کرد. جایگاه پروتئین Chk۲ به طور طبیعی در هسته سلول یوکاریوت است. همچنین جایگاه پروتئینی که با پروتئین Chk۲ در سیستم هیبریداسیون مخمر کنش نشان داد در سلول یوکاریوتی مشخص گردید. در مواردی که جایگاه این پروتئین در سیتوپلاسم بود، نوع پیوند مجازی تلقی و از انتخاب مستثنی شد.

زیر واحد تنظیم کننده پروتئین فسفاتازی به نام PP2A با پروتئین Chk2 در سیستم مخمری کنش پروتئینی نشان داد. این پروتئین نقش مهمی در کنترل چرخه سلولی، همانندسازی DNA، فرآیند آپوپتوزیز و در انتقال سیگنال سلولی بعهده دارد.

بحث

پروتئین Chk۲ در کنترل چرخه سلولی نقش مهمی به عهده دارد. جهش از نوع هتروزیگوت در ژن کدکننده این پروتئین در بعضی سرطانهای فامیلی و غیرفامیلی مشاهده شده که نشانگر نقش مهم این ژن در کنترل سرطانهاست(۱۰-۸). در سلولهای پایه ای که ژن Chk۲ حذف شده به هنگام یونیزه شدن توسط اشعه گاما توانایی توقف چرخه سلولی در فاز G۲ وجود ندارد. در حالی که سلولهای طبیعی به هنگام یونیزه شدن توسط اشعه مذکور و ایجاد شکستگی مولکول وراثتی DNA، چرخه سلولی را جهت ترمیم DNA متوقف می کند و در صورتیکه آسیب وارده بر روی DNA عمده و غیرقابل ترمیم باشد، سلول وارد فرآیند مرگ برنامه ریزی شده سلولی می شود(۵). در سلولهای پایه ای که ژن Chk۲ حذف شده بود، فعال شدگی پروتئین P53 به هنگام یونیزه شدن سلولها توسط اشعه گاما صورت نمی پذیرد. عدم فعال شدگی پروتئین P۵۳ مانع ورود سلولهای حاوی DNA آسیب دیده به فرآیند آپوپتوزیز می شود. بنابراین در غیاب پروتئین سالم Chk۲، سلولهایی که در اثر اشعه گاما متحمل شکستگی DNA شده اند، علیرغم شکستگی و آسیب های وارده DNA به تقسیم سلولی ادامه می دهند و سلولهای دختر حاصل از این سلولها سرطانی می شود(۵). پروتئینهایی که در فرآیند توقف چرخه سلولی به هنگام شکستگی DNA با پروتئین Chk۲ واکنش می دهند و به نحوی در انتقال سیگنال در این مسیر دخالت دارند، نقش موثری در کنترل این چرخه دارند. هرگونه نقص در بیان یا ساختمان این پروتئین ها، منجر به عدم کنترل دقیق چرخه سلولی و بروز سرطان می شود. مطالعاتی که در این پروژه با استفاده از سیستم هیبریداسیون مخمری صورت پذیرفت، نشان داده است که پروتئین PP۲A با پروتئین Chk۲ کنش پروتئینی دارد. نظر به این که ساختمان پروتئین PP۲A در مسیر تکاملی موجودات زنده حفظ شده و نقش آن در چرخه سلولی، فرآیند آپوپتوزیز و همانندسازی مولکول DNA نشان داده شده است(۱۱-۱۴)، وجود چنین کنش پروتئینی نشاندهنده اهمیت وافر این پروتئین به هنگام شکستگی DNA است. مطالعه بیشتر این پروتئین در سطح سلولهای یوکاریوت در مراحل مختلف سلولی نظیر تقسیم سلولی، شکستگی DNA یا آپوپتوزیز حایز اهمیت خواهد بود. همچنین مطالعه ژن مذکور از نظر ساختمانی و میزان بیان در افراد مبتلا به سرطان با علل نامشخص ژنتیکی اهمیت نقش آن در بروز سرطان را نشان خواهد داد.

نتیجه گیری

سیستم قوی و قابل اعتماد هیبریداسیون مخمری که توانایی پیدا کردن کنش بین پروتئین ها را دارد، نشانگر وجود پیوند بین دو پروتئین Chk۲ و پروتئین PP۲A است. با توجه به اینکه پروتئین Chk۲ در کنترل چرخه سلولی خصوصاً به هنگام شکستگی DNA نقش مهمی به عهده دارد، آگاهی از پروتئینی که با آن در کنش بوده باشد، حایز اهمیت خاصی است. مطالعه ژن کد کننده پروتئین PP۲A در بیماران مبتلا به سرطان با علت نامشخص ژنتیکی اطلاعات بیشتری در نقش احتمالی این ژن در سلولهای طبیعی و سرطانی در اختیار خواهد گذاشت.

تقدیر و تشکر

این پروژه در دانشگاه پل ساباتیه (تولوز فرانسه) انجام گرفت و سازمان CNRS فرانسه این پروژه و محقق رابط را از نظر مالی به طور کامل حمایت کرد. مؤلفین همچنین از داوران محترم به دلیل ارایه نظرات مفید سپاسگزاری می کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Cancer Medicine 5. (Book) (American Cancer Society), Cell Proliferation, Differentiation, and Apoptosis. Michael Andreeff ,David W. Goodrich, Arthur B. Pardee. 2003; PP: 340-380.
2. Elledge SJ, Cell cycle checkpoints. preventing an identity crisis. Science, 1996; 274: 1664-1672.
3. Zhou BB and Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 2000; 408: 433-439.
4. Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH and Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. Nature, 2000; 404: 201-204.
5. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, etal. DNA damage-induced activation of p_{53} by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, 2000; 287: 1824-1827.
6. Zeng Y and Piwnica-Worms H, DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol*, 1999; 19: 7410-7419.
7. Coates PJ, Hall PA. The yeast two-hybrid system for identifying protein-protein interactions. *J Pathol* 2003; 199(1): 4-7.
8. Bell DW, Varley JM, Szylto TE, Kang DH, Wharer DCR, Shannon KE, etal. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 1999; 286: 2528-2531.
9. Hofmann WK, Miller CW, Tsukasaki K, Tavor S, Ikezoe T, Hoelzer D, etal. Mutation analysis of the DNA-damage checkpoint gene CHK2 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Leuk Res* 2001; 25: 333-338.
10. Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, Eerola H, Eklund C, Aaltonen LA, etal. p53, CHK2, and CHK1 genes in finish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 2001; 61: 5718-5722.
11. Felix MA, Cohen P and Karsenti E. Cdc2 H1 kinase negatively regulated by a type 2A phosphatase in the Xenopus early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. *EMBO J* 1990; 9: 675-683.
12. Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 397-411.
13. Lee TH, Turck C, Kirschner MW. Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 323-338.
14. Guo CY, Brautigan DL, Larner JM. ATM-dependent dissociation of B55 regulatory subunit from nuclear PP2A in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 2002; 277: 4839-4844.

1. Stem Cells

www.SID.ir