استفاده از پروتئين هاي نوتركيب به هم پيوسته در ابداع يك سيستم نو به منظور شناسايي پروتئازهاي سيتوپلاسمي جديد

دكتر محمد سعيد حجازي: استاديار گروه بيوتكنولوژي دارويي، دانشكده داروسازي و مركز تحقيقات كاربردي دارويي، دانشگاه علوم پزشكي تبريز: نويسنده رابط
E-mail: saeidhejazi@tbzmed.ac.ir
دكتر يوپ گيكن: مدرس ارشد گروه پزشكي مولكولي، انستيتو رين، كينگز كالج، دانشگاه لندن
پروفسور فرزين فرزانه: استاد پزشكي مولكولي، انستيتو رين، كينگز كالج، دانشگاه لندن

دريافت: ۸۲/۱۰/۱۰، باز نگري نهايي: ۸۳/٦/۱٤، پذيرش: ۸۳/٦/۲۱

چكيده

زمينه و اهداف: با توجه به اهميت و نقشي كه اندوپروتئازها در فيزيولوژي سلولي و ايجاد بيماري ها دارند و با عنايت به اينكه تاكنون تعداد معدودي از پروتئازهاي جايگاه گزين شناخته شده اند، ابداع روش بيولوژيك تكرار پذير و قابل اعتمادي كه شناسايي اندوپروتئازهاي جايگاه گزين را ميسر سازد، از اهميت بسزايي برخوردار خواهد بود. بر اين اساس در تحقيق حاضر با به كارگيري پروتئين هاي نوتركيب به هم پيوسته سيستم بيولوژيك جديدي جهت شناسايي پروتئازهاي سيتوپلاسمي جايگاه گزين ابداع گرديد. براي ابداع سيستم مورد نظر از تركيب عملكرد دو پروتئين نوتركيب GAL٤-VP١٦ و HSV.tk-Zeo استفاده شد.

روش بررسي: براي ساختن وكتورها از روش هاي بيولوژي مولكولي استفاده شد. وكتورهاي ساخته شده توسط باكتري هاي پذيرا تكثير داده شدند و جهت بررسي كارآيي آنها از سلول هاي HeLa استفاده شد. بدين منظور سلول هاي حيواني با وكتورهاي ساخته شده ترانسفكت و تكثير داده شدند. سپس با استفاده از آزمايش MTT حساسيت سلول ها به داروها مطالعه شد.

يافته ها: سلول هاي HeLa با وكتور pcDBHZm كه حاوي كاست القاپذير HSV.tk-Zeo بود، ترانسفكت شده و با داروي G٤١٨ انتخاب و تكثير داده شدند. سپس سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm مجدداً با پلاسميد ديگري به نام pcG٤VP١٦، كه طي اين مطالعه ساخته شده بود، ترانسفكت شدند. در اين مرحله، حساسيت دو نوع سلول ترانسفكت شده نسبت به داروي GCV، در مقايسه با سلول هاي ترانسفكت نشده (كنترل منفي) و سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pCCI (كنترل مثبت) ارزيابي شد. نتايج به دست آمده نشان داد كه سلول هاي ترانسفكت شده با pcDBHZm حدود ۳۰ برابر مقاوم تر از سلول هاي pcDBHZm+pG4VP١٦ به GCV بودند. متعاقب اثبات اين امر، پلاسميد pcG4mVP ساخته شد. در اين پلاسميد محل برش چند آنزيم محدودگر ما بين قطعه نوكلئوتيدي GAL٤ و VP١٦ ايجاد شد تا امكان قرار دادن كتابخانه نوكلئوتيدي يا توالي هاي مشخص را فراهم آورد كه به ترتيب براي شناسايي پروتئازهاي جديد و بررسي وجود پروتئازهاي شناخته شده در سلول هاي مختلف مورد استفاده قرار مي گيرد.

نتيجه گيري: نتايج به دست آمده مؤيد كاركرد سيستم ابداع شده بود. بدين صورت كه در سيستم ابداع شده، بيان كاست HSV.tk-Zeo تحت كنترل پروتئين مركب GAL٤-VP١٦ بوده و در حضور اين پروتئين، cDNA هاي مزبور بيان مي شوند. بيان كاست مزبور حساسيت سلول ها به GCV را در مقايسه با موقعي كه VP١٦-GAL٤ در سلول ها غير فعال است، حدود ۳۰ برابر افزايش مي دهد و باعث كشته شدن سلول هاي محتوي GAL٤-VP١٦ فعال در حضور GCV مي شود (انتخاب منفي). اين امر امكان جدا سازي سلول هاي محتوي GAL٤-VP١٦ غير فعال (متعاقب هضم آنزيمي پروتئين مزبور) از سلول هاي محتوي GAL٤-VP١٦ فعال (به دليل عدم هضم آنزيمي پروتئين مزبور) را در حضور GCV ميسر مي سازد.

كليد واژه ها: اندوپروتئاز، جايگاه گزين، GAL٤-VP١٦، HSV.tk-Zeo

مقدمه

اندوپروتئازها نقش بسيار مهمي در فيزيولوژي سلولي دارند. دسته اي از اين اندوپروتئازها توالي هاي اسيد آمينه اي خاصي را شناسايي و هضم مي كنند. بر خلاف پروتئازهاي موجود در ليزوزيم ها و سيستم يوبيكوئيتين، كه پروتئين ها را به اجزا سازنده آنها يعني اسيدهاي آمينه مي شكنند و باعث تخريب و از بين رفتن پروتئين هدف مي شوند، اين پروتئازها جايگاه گزين[1] هستند. جايگاه هاي مزبور در واقع توالي اسيد آمينه هاي معيني هستند كه توسط پروتئازهاي سلولي شناسايي و شكسته مي شوند (۱). در صورت تغيير توالي اسيد آمينه در زنجيره، سوبسترا توسط پروتئين شناسايي و شكسته نخواهد شد. با مكانيسم هاي فوق پروتئازها مي توانند در فعال شدن و فرآوري پروتئين ها، گيرنده ها و آنتي ژن ها و همچنين در ايجاد بيماري ها مؤثر باشند (۲، ۳، ٤و÷). از اين رو، پروتئازها و مهار آنها يكي از مباحث مهم در

1. Site specific

Archive of SID
www.SID.ir

درمان بيماري ها از قبيل ايدز است (٦و ٧). از پروتئازهاي جايگاه گزين مي توان به آنزيم تبديل كننده اينترلوكين-١ بتا با علامت اختصاري ICE اشاره كرد. اين آنزيم پيشتاز اينترلوكين –١ را كه يك پروتئين غير فعال است، از محل پيوند بين اسيد آمينه ١١٦ و ١١٧ هضم مي كند كه منجر به توليد اينترلوكين –١ بتاي فعال مي شود. محل شناسايي اختصاصي اين آنزيم زنجيره اي پلي پپتيدي متشكل از چهار اسيد آمينه است. توالي زنجيره مزبور به صورت YVAD (تيروزين، والين، آلانين و اسيد آسپارتيك) است. اين توالي در پيشتاز اينترلوكين –١ بتا، جايگاه هاي ١١٣ تا ١١٦ را تشكيل مي دهد و باعث شناسايي و هضم آن توسط آنزيم ICE مي شود (٨). مطالعات نشان داده اند كه سلول هاي فاقد اين آنزيم قادر به توليد اينترلوكين-١ بتا نخواهند بود، حتي اگر با استفاده از وكتورها، پيشتاز اينترلوكين –١ بتا در اين سلول ها بيان شود (٩). هضم آنزيمي پروتئين ها در فعال شدن و تبديل پيش پروتئين ها به پروتئين هاي فعال بسيار مهم است. با توجه به اهميت پروتئازهاي اختصاصي جايگاه در پرورش پروتئين ها و فيزيولوژي سلولي، وجود يك سيستم بيولوژيك كه امكان شناسايي پروتئازهاي جديد را فراهم سازد بسيار مهم است. HSV.tk-Zeo ژن مركبي است كه از تركيب دو cDNA ي HSV.tk و Zeo تشكيل يافته است. قسمت HSV.tk كه در انتهاي ´÷ اين ژن مركب قرار گرفته، آنزيم تيميدين كيناز ويروس هرپس (HSV.TK) را كد مي كند. اين آنزيم پيش داروي گنسيكلووير (GCV) را به شكل فعال تري فسفات آن (GCV-P3) تبديل مي كند كه يك عامل سيتوتوكسيك است و باعث مرگ سلول ها مي شود. بنابراين بيان اين آنزيم در سلول ها آنها را نسبت به GCV حساس مي كند. در عدم حضور HSV.TK، پيش داروي GCV به مقدار بسيار كمتر فسفاته شده و براي سلول ها سمي نيست. جزء Zeo كه در انتهاي ´٣ اين ژن مركب قرار گرفته است پروتئين Sh.ble را كد مي كند كه عامل مقاومت به داروي زئوسين است و از اين رو جهت اختصار با نام Zeo نيز خوانده مي شود. اين پروتئين ١٣ كيلو دالتون وزن دارد (١٠و١١) و محصول ژن Sh.ble است. اين پروتئين به صورت استوكيومتري به زئوسين مي چسبد و از اتصال آن به DNA جلوگيري مي كند. زئوسين عضوي از خانواده بلئومايسين فلئومايسين است كه از استرپتومايسس ورتيسيلوس به دست مي آيد. اين دارو خاصيت ضد باكتريايي (١٠و١١)، ضد قارچي، ضد مخمري (١٢)، ضد سلول گياهي (١٣) و سلول هاي حيواني(١٤) دارد. از اين رو، اين دارو براي انتخاب و جداسازي سلول ها مورد استفاده قرار مي گيرد. در عدم حضور پروتئين Zeo، سلول ها به عامل زئوسين حساس هستند و در مجاورت با آن مي ميرند. بيان زئوسين باعث ايجاد مقاومت به آن در سلول ها مي شود. نكته حايز اهميت در تركيب اين پروتئين مركب اين است كه قسمت HSV.TK آن باعث ايجاد حساسيت به عامل GCV ولي در عوض، جزء Zeo آن باعث بروز مقاومت به داروي زئوسين مي شود. در واقع، جزء HSV.TK، امكان انتخاب منفي و جزء Zeo امكان انتخاب مثبت سلول ها را فراهم مي كند. تركيب دو انتخاب مثبت و منفي در اين پروتئين مركب اين امكان را فراهم مي كند كه سلول هاي حاوي پروتئين مزبور را از ساير سلول هاي فاقد اين پروتئين، به صورت انتخابي زنده نگه داشت (با استفاده از زئوسين) يا اينكه از بين برد (با استفاده از GCV).

پروتئين مركب GAL٤-VP١٦ از قسمت متصل شونده به DNA ي پروتئين GAL٤ GAL٤ و پروتئين ترانس اكتيواتور VP١٦ تشكيل يافته است (÷١و١٦).

هدف عمده تحقيق حاضر به كارگيري پروتئين هاي نوتركيب به هم پيوسته براي ابداع سيستم بيولوژيك جديدي است كه جهت شناسايي پروتئازهاي جديد و شناخته نشده سيتوپلاسمي و همچنين بررسي وجود پروتئازهاي شناخته شده قبلي در سلول هاي مختلف مورد استفاده قرار مي گيرد. در اين سيستم دو پروتئين نوتركيب ١٦-GAL٤VP و HSV.tk-Zeo به كار گرفته شده است.HSV.tk-Zeo به عنوان ژن نشانه يا گزارشگر به كار رفته كه رونويسي آن تحت كنترل پروتئين مركب GAL٤-VP١٦ قرار داده شده است.

مواد و روش ها

پلاسميد pCCI: پلاسميدي با پايه رتروويروسي كه داراي ٦٠٤٣ جفت باز است. اين پلاسميد ژن مركب HSV.tk-Zeo را كد مي كند كه به صورت همزمان، حساسيت به پيش داروي GCV و مقاومت به عامل سيتوتوكسيك زئوسين را ايجاد مي كند. در ساختمان اين وكتور قبل از HSV.tk-Zeo پروموتورهاي SV٤٠ و EM-٧ قرار گرفته اند. پايين دست ژن HSV.tk-Zeo، توالي چند آدنيله SV٤٠ قرار دارد (١٧).

پلاسميد pcDNA٣,١(-)/Neo: يك پلاسميد بيان كننده (÷٤ kb) است كه داراي قسمت كلون كننده چندگانه جهت كلون كردن ژن هاي مختلف است. ژن كلون شده توسط پروموتور ويروس سايتومگال (CMV) رانده شده و با توالي چند آدنيله ويروس SV٤٠ آدنيله مي شود. اين پلاسميد همچنين داراي يك كاست القا كننده مقاومت به نئومايسين است.

لينكرها و پرايمرها: براي ساخت وكتورهاي جديد از دو لينكر مختلف ساخت كارخانه MWG-Biotech آلمان با اسامي(L)NX با توالي ٣ AATTCGCGGCCGCCCCCTCTAGAC÷ و (R)NX با توالي نوكلئوتيدي ٣ AATTGTCTAGAGGGGGCGGCCGCG ÷ استفاده شد.

آنزيم هاي محدود كننده و پيوند دهنده: براي بريدن DNA از آنزيم هاي محدود كننده مختلفي شامل آنزيم هاي *Nhe*I ، *Hin*dIII ، *Eco*RI ، *Not*I و *Xho*I و به منظور پيوند دادن قطعات مختلف DNA به همديگر، از آنزيم T٤ DNA Ligase ساخت كارخانه NEB استفاده شد.

الكتروفورز روي ژل: الكتروفورز روي ژل با غلظت تقريبي w/v ١ درصد محتوي اتيديوم بروماید جهت جداسازي قطعات مختلف DNA بر اساس اندازه آن ها انجام گرفت.

استخراج DNA از ژل: براي استخراج DNA از ژل، از كيت استخراج QIAEX II استفاده شد. ابتدا باند DNA از ژل بريده و پس از طي مراحل استخراج DNA ي استخراج شده در محلول Tris حل شد.

رده سلولي HeLa و كشت سلولي: در اين مطالعه از سلول هاي HeLa براي بيان انواع پروتئين ها و بررسي فعاليت آنها استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

سلول هاي HeLa، از نوع سلول هاي آدنوكارسينوم و جزء سلول هاي چسبان هستند كه در محيط DMEM محتوي ۱۰ در صد سرم جنين گاو (FCS) كشت داده شده و در انكوباتور $37^{o}C$ و در حضور CO_2 به مقدارČ درصد انكوبه شدند. سلول ها هر۳-۲ روز تقسيم مي شدند.

ترانسفكت كردن سلول ها: هدف از انجام اين آزمايش بيان پروتئين نوتركيب در سلول هاي حيواني با استفاده از پلاسميد است. براي ترانسفكت كردن سلول ها از روش رسوب با كلسيم فسفات استفاده شد. حدود ٤٨ ساعت پس از ترانسفكشن آنتي بيوتيك هاي مورد نظر به پليت ها افزوده شد. بعد از حدود يك هفته، كلوني سلول هاي ترانسفكت شده ظاهر و سپس تكثير داده شدند تا آزمايش هاي بعدي با استفاده از آنها انجام گيرد.

گنسيكلوويرGCV: گنسيكلوويرآنالوگ صناعي گوانين (G) و مشتق آسيكلوويراست. GCV پيش دارو با خاصيت ضد ويروسي است كه براي اولين مرتبه براي درمان آلودگي با ويروس هرپس سيمپلكس ساخته شد. اين دارو از ريليكاسين ويروس به صورت *in vitro* و *in vivo* از طريق جلوگيري از سنتز DNA ممانعت مي كند. GCV پس از سه مرتبه فسفريله شدن تبديل به GCV-P۳ مي شود كه شكل فعال GCV است. اين عمل توسط يك سري آنزيم هاي كيناز سلولي انجام مي گيرد. آنزيم HSV.TK پيش داروي GCV را به شكل يك فسفاته (GCV-P۱) تبديل مي كند. قدرت اين آنزيم در تبديل GCV به GCV-P۱، هزار مرتبه بيشتر از قدرت آنزيم هاي كيناز سلول است (۱۸). اين خاصيت HSV.TK باعث شده است تا از آن به عنوان يك عامل مهم در از بين بردن سلول ها به طريق خود كشي وابسته به GCV در پروتكل هاي ژن درماني استفاده شود(۱۹).

آزمايش MTT: آزمايش حساسيت دارويي به عنوان معياري براي بررسي حضور پلاسميد در سلول ها و همچنين بررسي ميزان بيان و فعاليت پروتئين نوتركيب مورد استفاده قرار گرفت. هدف از اين آزمايش بررسي مقاومت و حساسيت سلول ها نسبت به داروها متعاقب انتقال پلاسميد به آنها و مقايسه آن با ساير سلول ها بود. اين آزمايش با استفاده از روش MTT انجام گرفت. اين آزمايش را اولين بار موسمن (۲۰) ابداع كرد. در طي اين آزمايش نمك زرد رنگ و محلول در آب ترازوليوم -۲,۵-(۲-(۴, ۵-dimethythiazolyl-۳)-diphenyltetrazolium bromide; MTT) در اثر احيا سلولي به فورمازان بنفش رنگ نا محلول در آب حل مي شود (۲۰و ۲۱). مطالعات نشان داده است كه اين آزمايش مي‌تواند به عنوان معرفي براي تكثير سلول ها در پاسخ به عوامل مختلف، از قبيل هورمون رشد و نظاير آن مورد استفاده قرار گيرد (۲۲، ۲۳، ۲٤و÷۲).

يافته ها

ساخت پلاسميد pcG٤VP17: براي ساخت اين پلاسميد ابتدا وكتور pM1V١٦ با دو آنزيم *Nhe*I و *Hin*dIII بريده شد تا قطعه ١٦-GAL٤VP آن خارج شود. همزمان با آن پلاسميد (-)pcDNA٣,١ با همان آنزيم ها (*Nhe*I و *Hin*dIII) بريده شد و سپس محصولات هضم آنزيمي روي ژل الكتروفورز گرديد. پس از انجام الكتروفورز روي ژل باندهاي DNA ي مورد نظر از ژل بريده شد و DNA هاي هضم شده از ژل استخراج گرديد. پس از آماده كردن قطعات DNA ي خالص با كمك آنزيم ليگاز T٤، توالي كد كننده GAL٤-VP١٦ درون پلاسميد (-)pcDNA٣,١ كلون شد. باكتري هاي پذيراي *E.coli* با محصول لايگيشن ترانسفورم شدند. از محصول ترانسفورماسيون چند كلوني برداشته شده و DNA ي پلاسميدي از آنها استخراج شد. جهت بررسي وجود قطعه GAL٤-VP١٦ درون پلاسميد ساخته شده، نمونه ها را با آنزيم هاي فوق الذكر هضم و محصول هضم شده روي ژل الكتروفورز گرديد. وجود باندي در حدود ۱۲۰۰ جفت باز انجام موفقيت آميز مراحل بالا و وجود قطعه GAL٤-VP١٦ درون محصول تهيه شده را تأييد كرد (*شكل ۱*).

پلاسميد ساخته شده وكتور بيان كننده يوكاريوتيك با ٦٨÷٦ جفت باز است. اين وكتور بر خلاف پلاسميد اوليه pM1V١٦ كه فاقد ماركر انتخابي بود و جداسازي سلول هاي ترانسفكت شده از سلول هاي ترانسفكت نشده با آن مقدور نبود، داراي كاست بيان كننده ئومايسين است كه انتخاب و جداسازي سلول هاي ترانسفكت شده را امكان پذير مي سازد. اين پلاسميد همچنين داراي اينسرت GAL٤-VP١٦ است كه اسيدهاي آمينه ١-١٤٧ از ناحيه N- ترمينال پروتئين GAL٤ را كد مي كند كه در واقع قسمت متصل شونده به DNA از اين پروتئين است. در پايين دست توالي GAL٤ از قطعه خارج شده توالي كد كننده اسيدهاي آمينه ٤١٣-٤٩٠ از پروتئين VP١٦ قرار دارد كه به درستي (in frame) به GAL٤ پيوسته است كه بصورت متصل به هم توانايي فعل كردن عمل ترجمه را دارند (÷۱و ١٦) و به صورت مستقل فاقد اين توانايي هستند (٢٦، ٢٧، ٢٨و ٢٩) . ما بين توالي كد كننده آخرين اسيد آمينه و جايگاه آنزيم HindIII حدود ۰۰÷ جفت باز غير فعال وجود دارد. اين امر باعث مي شود تا طول قطعه جدا شده و كلون شده درون پلاسميد موجود به حدود ۱۲۰۰ جفت باز برسد. در توالي مزبور با ۲۱ جفت باز به همديگر پيوسته اند كه ۷ اسيد آمينه را كد مي كند. در اين توالي جايگاه برش براي آنزيم هاي *Eco*RI و *Sma*I قرار دارد كه از اين دو جايگاه ها، محل برش براي آنزيم *Eco*RI منحصر به فرد است (÷۱).

ساخت پلاسميد pcG4mVP: هدف از ساختن اين پلاسميد تهيه وكتوري بود كه امكان كلون كردن توالي هاي كد كننده متعدد و همچنين كتابخانه اليگونوكلئوتيد ما بين قطعات كد كننده GAL٤ و ١٦ VP را فراهم آورد. براي ساختن پلاسميد pcG٤mVP از پلاسميد ١٦ pcG٤VP استفاده شد. ابتدا پلاسميد مزبور با آنزيم *Eco*RI برش داده شد. آنزيم مزبور پلاسميد را از تنها جايگاه *Eco*RI كه بين توالي هاي كد كننده GAL٤ و VP١٦ قرار دارد برش مي دهد و آن را به شكل خطي در مي آورد. پس از هضم پلاسميد، محصول به دست آمده روي ژل الكتروفورز و سپس باند مربوطه جدا و در نهايت DNA از ژل استخراج شد. از طرف ديگر، لينكر هاي NX(L) و NX(R) با همديگر آنيل شدند. عمل لايگيشن ما بين محصول آنيلينگ و DNA ي استخراج شده از ژل در حضور آنزيم T٤ ليگاز انجام و ترانسفورماسيون باكتري هاي پذيراي *E.coli* با محصول لايگيشن

Archive of SID

www.SID.ir

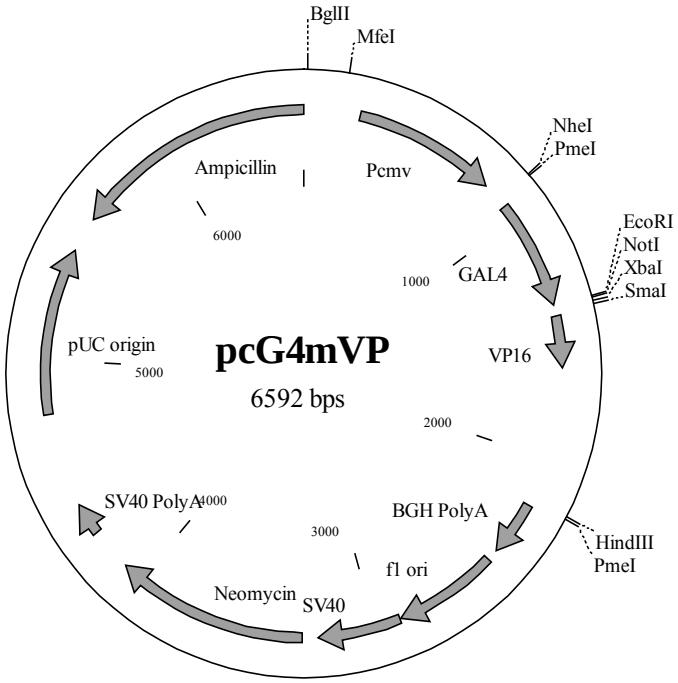
انجام يافت. از باكتري هاي ترانسفورم شده چند كلوني برداشته و كشت داده شدند و در نهايت DNA ي پلاسميدي از باكتري ها استخراج شد. جهت بررسي موفقيت آميز عمل اينسرشن، نمونه هاي پلاسميدي با آنزيم هاي *Pme*I و *Xba*I هضم شدند. وجود باند هاي تقريبي ٤÷٠ و ٨٠٠ جفت بازي مؤيد لايگيشن لينكرها درون پلاسميد بود (*شكل ٢*).

پلاسميد حاصل محتوي توالي هاي كد كننده GAL٤ و VP١٦ بود كه مابين توالي هاي كد كننده فوق داراي جايگاه هاي برش براي آنزيم هاي محدود كننده *Xba*I ، *Not*I و *Eco*RI بود. وجود اين جايگاه ها امكان كلون سازي توالي هاي متعدد و همچنين كتابخانه اليگو نوكلئوتيدي بين دو قطعه DNA را با جهت مشخص فراهم مي آورد.

ترانسفكت كردن سلول ها با پلاسميد pcDBHZm و تكثير سلول هاي ترانسفكت شده: ابتدا سلول هاي HeLa به روش رسوب با فسفات كلسيم با پلاسميد pcDBHZm ترانسفكت شدند. سپس در حضور µg/ml ٩٠٠ از عامل سيتوتوكسيك G٤١٨، سلول هاي ترانسفكت شده از سلول هاي ترانسفكت نشده جدا و جهت استفاده در آزمايش هاي بعدي تكثير داده شدند. اين پلاسميد فاقد پروموتور قوي در بالادست ژن HSV.tk-Zeo بوده و تنها داراي توالي اتصالي ٤ GAL است. بنابراين در سلول هاي ترانسفكت شده با اين پلاسميد، ژن مزبور بيان نشده است و به صورت خاموش مي ماند، مگر اينكه پروتئين GAL٤-VP١٦ در سلول ها بيان شود.

ترانسفكت كردن سلول ها با پلاسميد pCCI: به منظور تهيه سلول هاي شاهد مثبت، سلول هاي HeLa با پلاسميد pCCI كه كد كننده HSV.tk-Zeo بود، به روش رسوب با فسفات كلسيم ترانسفكت شدند. سپس سلول هاي ترانسفكت شده در حضور زئوسين به غلظت µg/ml ١٢٠ از سلول هاي ترانسفكت نشده جدا سازي شدند. سپس سلول هاي جدا شده جهت استفاده در آزمايش هاي بعدي تحت همان شرايط تكثير داده شدند.

ترانسفكت كردن مجدد سلول هاي ترانسفكت شده با pcDBHZm با پلاسميد pcG٤VP١٦: به منظور بررسي قدرت القايي پلاسميد VP١٦ pcG٤ در القاء بيان ماركر HSV.tk-Zeo، سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm مجدداً با پلاسميد pcG٤VP١٦ ترانسفكت شدند. عمل ترانسفكشن به روش رسوب با فسفات كلسيم انجام گرفت. سپس، سلول هاي ترانسفكت شده در حضور زئوسين به غلظت µg/ml ١÷٠ از سلول هاي ترانسفكت نشده جدا سازي و تكثير داده شدند. سلول هاي به دست آمده pcG٤VP١٦+ pcDBHZM ناميده شدند.



شكل ١: ساختمان پلاسميد pcG٤mVP. اين پلاسميد پروتئين pcG٤VP١٦ را به وسيله پروموتور ويروس سيتومگالو (CMV) كد مي كند. ما بين DNA هاي مزبور محل هاي برش براي آنزيم هاي EcoRI ، NotI وXbaI قرار داشته شده است. اين جايگاه ها جهت كلون كردن كتابخانه اليگونوكلئوتيد و انواع توالي هاي كد كننده زنجيره هاي اسيد آمينه ايجاد شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسي حساسيت سلول هاي ترانسفكت نشده، ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm و pcDBHZM+pcGΕVP16 به GΕ18: جهت بررسي وجود پلاسميد در سلول هاي جدا شده، مقاومت آنها در برابر عامل سيتوتوكسيك GΕ18 به روش MTT و در حضور GΕ18 با غلظت هاي صفر، ÷2و ۱۰۰۰ ميكروگرم در هر ميلي ليتر بررسي شد. در اين آزمايش از سلول هاي ترانسفكت نشده به عنوان كنترل منفي استفاده شد. نتايج به دست آمده نشان داد كه در غلظت صفر از GΕ18 ۱۰۰ در صد سلول هاي ترانسفكت نشده، ترانسفكت شده با pcDBHZm و pcDBHZM+pcGΕVP16 زنده ماندند، در حالي كه با افزايش غلظت GΕ18 به µg/ml ÷200، ميزان سلول هاي زنده مانده از سلول هاي ترانسفكت نشده به ۷۰ درصد و درغلظت µg/ml۱۰۰۰ به حدود ÷ در صد افت كرد. اين در حالي بود كه ميزان سلول هاي زنده در هر دو نوع سلول هاي ترانسفكت شده در هر سه غلظت فوق بيش از ÷8 در صد بود (*جدول ۱*). اين نتايج نشان داد كه سلول هاي تكثير يافته محتوي پلاسميد هاي ترانسفورم شده بود و نتايج حاصل به فعاليت پلاسميدها مي تواند تعميم داده شود.

بررسي حساسيت سلول ها ي ترانسفكت نشده ، ترانسفكت شده با pcDBHZm ،pcDBHZM+pcGΕVP16 و pCCI به GCV: جهت بررسي قدرت القا كنندگي سيستم تهيه شده، حساسيت سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm و سلول هاي ترانسفكت شده pcDBHZM+pcGΕVP16 به GCV آزمايش شد. در اين مطالعه از سلوله اي ترانسفكت نشده به عنوان كنترل منفي و از سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pCCI به عنوان كنترل مثبت استفاده شد. حساسيت سلول ها به روش MTT و با غلظت سلولي 10^4 cells/well *۱ در حضورGCV با غلظت هاي صفر، ۰/۱، ۱و ۱۰ ميكروگرم در هر ميلي ليتر انجام گرفت. داده ها نشان دادند كه در غلظت صفر از GCV، ۱۰۰ در صد سلول هاي ترانسفكت نشده، ترانسفكت شده با pCCI ، pcDBHZm و pcDBHZM+pcGΕVP16 زنده ماندند. با افزايش غلظت GCV به µg/ml ۱ /۰، ميزان سلول هاي زنده مانده از سلول هاي ترانسفكت شده با pcDBHZm حدود ۹۶ در صد و در غلظت µg/ml ۱ به مقدار ۸۸ در صد و در بالاترين غلظت GCV حدود ۹۰ در صد بود. سلول هاي ترانسفكت نشده نيز نتايجي مشابه سلول هاي pcDBHZm نشان دادند. اين در حالي بود كه ميزان سلول هاي زنده از سلول هاي pcDBHZM+pcGΕVP16 در عدم حضور GCV غلظت هاي فوق از همان دارو از ۱۰۰ درصد به ترتيب به ۶۲ درصد، ۳۲ درصد و ۳ در صد كاهش يافت. حساسيت سلول هاي آلوده شده با پلاسميد pCCI تقريباً مشابه سلول هاي اخير بود كه به ترتيب مقدار سلول هاي زنده آنها در عدم حضور GCV و غلظت هاي افزايش يابنده آن به ترتيب ۱۰۰ در صد ، ۹۲ درصد ، ۳۴ درصد و ۲۱ در صد بود. داده ها نشان مي دهند كه درصد سلول هاي زنده pcDBHZm در غلظت µg/ml ۱۰ از GCV حدود ۳۰ برابر بيشتر از مقدار سلول هاي زنده از نوع pcDBHZM+pcGΕVP16 در همان غلظت از دارو است (*جدول ۲*).

جدول ۱: ميزان سلول هاي زنده مانده از سلول هاي ترانسفكت نشده، ترانسفكت شده با pcDBHZm و pcDBHZM+pcGΕVP16 در غلظت هاي متغير GΕ18.

نوع سلول **(HeLa)**	غلظت GΕ18 **(µg/ml)**		
	۰µg/ml	۲۵۰µg/ml	۱۰۰۰µg/ml
ترانسفكت نشده	%۱۰۰	%۷۰	%۶,۵
ترانسفكت شده با pcDBHZm	%۱۰۰	%۹۶	%۸۹
ترانسفكت شده باpcDBHZM+pcGΕVP16	%۱۰۰	%۱۰۰	%۹۷

جدول ۲: ميزان سلول هاي زنده مانده از سلول هاي ترانسفكت نشده، ترانسفكت شده با pcDBHZm ، pcDBHZM+pcGΕVP16 و pCCI در غلظت هاي متغير GCV.

نوع سلول **(HeLa)**	غلظت **GCV (µg/ml)**			
	۰µg/ml	۰/۱µg/ml	۱ µg/ml	۱۰µg/ml
ترانسفكت نشده	%۱۰۰	%۸۷	%۸۱	%۸۰
ترانسفكت شده با pCCI	%۱۰۰	%۹۲	%۳۴	%۲۱
ترانسفكت شده با pcDBHZm	%۱۰۰	%۹۶	%۸۸	%۹۰
ترانسفكت شده باpcDBHZM+pcGΕVP16	%۱۰۰	%۶۲	%۳۲	%۳۲

Archive of SID

www.SID.ir

نتايج حاكي از آن بود كه سلول هاي ترانسفكت شده با pcDBHZm حساسيتي مشابه سلول هاي ترانسفكت نشده داشتند و نسبت به GCV مقاوم بودند كه دليل بر عدم بيان كاست HSV.tk-Zeo در اين سلول ها است. در حالي كه سلول هاي pcG٤VP١٦+ pcDBHZM حساسيتي شبيه سلول هاي pCCI نشان دادند كه بيانگر اين است كه سلول هاي pcDBHZM+pcG٤VP١٦ همانند سلول هاي كنترل مثبت pCCI كه به GCV حساسيت نشان دادند، به GCV حساس هستند. به عبارتي ديگر، كاست HSV.tk-Zeo در اين سلول ها به دليل حضور GAL٤-VP١٦ بيان مي شود.

بحث و نتيجه گيري

با توجه به اهميتي كه پروتئازهاي جايگاه گزين (١) در فيزيولوژي سلولي و بيماري ها (٢، ٣، ٤و÷) دارند وجود سيستمي قابل اعتماد، آسان و قابل تكرار كه امكان شناسايي پروتئازهاي جديد را ممكن سازد بسيار مهم است. هدف از مطالعه حاضر ابداع سيستمي براي شناسايي پروتئازهاي جديد جايگاه گزين و احياناً پروتئازهاي اختصاصي بافت و همچنين بررسي وجود پروتئازهاي شناخته شده در بافت هاي مختلف است.

سيستم ابداع شده مجموعه اي از دو پروتئين نوتركيب GAL٤-VP١٦ و HSV.tk-Zeo است. در اين تركيب از HSV.tk-Zeo به عنوان ژن گزارشگر استفاده شده كه رونويسي آن تحت كنترل GAL٤-VP١٦ قرار داده شده است. HSV.tk-Zeo ژن مركبي است كه قسمت HSV.tk آن آنزيم تيميدين كيناز ويروس هرپس (HSV.TK) را كد مي كند كه پيش داروي گنسيكلووير (GCV) را به شكل فعال تري فسفات آن (GCV-P3) تبديل مي كند كه عامل ستيوتوكسيك است و باعث مرگ سلول ها مي شود (١٨). در عدم حضور HSV.YK پيش داروي GCV به مقدار بسيار كم فسفاته شده و براي سلول ها سمي نيست. بنابراين بيان اين آنزيم در سلول ها آنها را نسبت به GCV حساس مي كند. جزء Zeo كه در انتهاي ´٣ اين ژن مركب قرار گرفته است، پروتئين zeo (Sh.ble) را كد مي كند كه عامل مقاومت به داروي زئوسين است (١٠، ١١ و١٤). بنابراين، قسمت HSV.TK-Zeo باعث ايجاد حساسيت به عامل GCV و مقاومت به زئوسين مي گردد. در واقع، جزء HSV.TK امكان كشتن سلول ها (انتخاب منفي) و جزء Zeo امكان زنده نگهداشتن (انتخاب مثبت) سلول ها را فراهم مي كند تا با كمك گيري از آن، سلول هاي حاوي پروتئين مزبور را از ساير سلول هاي فاقد اين پروتئين، به صورت انتخابي زنده نگه داشت (با استفاده از زئوسين) (١٠ و ١١) يا اينكه از بين برد (با استفاده از GCV) (١٩).

پروتئين مركب GAL٤-VP١٦ از قسمت متصل شونده به DNA ي پروتئين GAL٤ و ترانس اكتيواتور VP١٦ تشكيل يافته است (÷١و ١٦). اجزا اين پروتئين به تنهايي فاقد قدرت فعال سازي رونويسي هستند ولي موقعي كه به هم ديگر متصل مي شوند توانايي بيان ژن را دارند (٢٦، ٢٧، ٢٨ و ٢٩).

در اين مطالعه ابتدا سلول ها با وكتور pcDBHZm ترانسفكت شدند. پلاسميد مزبور محتوي كاست HSV.tk-Zeo است كه در آن توالي DNA ئي كه GAL٤ به آن متصل مي شود، پنج بار تكرار شده و به دنبال آن به ترتيب جعبه TATA و cDNA هاي كد كننده HSV.tk وZeo (HSV.tk-Zeo) قرار گرفته است. سلول هاي HeLa با وكتور pcDBHZm ترانسفكت شده و با داروي G٤١٨ انتخاب و سپس تكثير داده شدند. سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm، مجددا با پلاسميد ديگري به نام pcG٤VP١٦ كه طي اين مطالعه ساخته شده بود ترانسفكت شدند. جهت بررسي وجود پلاسميد در سلول هاي جدا شده مقاومت آنها در برابر عامل سيتوتوكسيك G٤١٨ به روش MTT بررسي شد (٢٠ و ٢١). نتايج به دست آمده نشان دادند كه سلول هاي تكثير يافته محتوي پلاسميد هاي ترانسفورم شده هستند و حساسيت يا مقاومت سلول هاي تهيه شده به GCV ناشي از فعاليت پلاسميدها خواهد بود. سپس حساسيت سلول هاي ترانسفكت شده با دو پلاسميد pcDBHZM+pcG٤VP١٦ نسبت به GCV در مقايسه با سلول هاي ترانسفكت شده با پلاسميد pcDBHZm بررسي شد. نتايج به دست آمده نشان داد كه حساسيت سلول هاي ترانسفكت شده به GCV همانند حساسيت سلول هاي ترانسفكت شده با pcDBHZm است. هر دو اين سلول ها نسبت به GCV مقاوم بودند و بيش از ٨٠ در صد سلول ها در غلظت µg/ml ١٠ از اين دارو زنده ماندند. در حالي كه سلول هاي pcDBHZM+pcG٤VP١٦ حساسيتي شبيه سلولهاي pCCI (كنترل مثبت) (١٧) داشتند. بدين معني كه سلول هاي pcDBHZM+pcG٤VP١٦، همانند سلول هاي كنترل مثبت ترانسفكت شده با pCCI، نسبت به GCV حساس بودند. در صد رشد و زنده بودن اين سلول ها با افزايش غلظت GCV به شدت كاهش يافت، به طوري كه در غلظت µg/ml ١٠ از GCV حدود ٣ در صد از سلول هاي ترانسفكت شده با دو پلاسميد زنده ماندند.

تشابه رفتاري و مقاومت سلول هاي pcDBHZm و سلول هاي ترانسفكت نشده بيانگر عدم بيان كاست HSV.tk-Zeo در اين سلول ها است. به عبارتي ديگر، كاست HSV.tk-Zeo در اين سلول ها به دليل عدم حضور GAL٤-VP١٦ بيان نمي شود. از طرف ديگر، حساسيت زياد سلول هاي pcDBHZM+pcG٤VP١٦ دليل بر بيان كاست HSV.tk-Zeo به علت بيان پروتئين GAL٤-VP١٦ در اين سلول ها بود. نتايج فوق نشان دادند كه بيان كاست HSV.tk-Zeo كاملاً تحت كنترل پروتئين مركب GAL٤-VP١٦ است و در حضور اين پروتئين cDNA هاي مزبور بيان مي شوند. در صد سلول هاي زنده pcDBHZm در غلظت µg/ml ١٠ از GCV حدود ٣٠ برابر بيشتر از مقدار سلول هاي زنده از نوع pcDBHZM+pcG٤VP١٦ در همان غلظت از دارو بود. يعني حساسيت سلول ها به GCV در حضور و عدم حضور GAL٤-VP١٦، حدود ٣٠ برابر تغيير مي كند. بنابراين سيستم ابداع شده امكان جداسازي سلول ها با استفاده از داروي GCV را در حالت فعاليت و عدم فعاليت GAL٤-VP١٦ ميسر مي سازد.

به دنبال اثبات صحت پلاسميدهاي ساخته شده و كاركرد آنها پلاسميد ديگري به نام pcG٤mVP ساخته شد. در اين پلاسميد محل برش آنزيم هاي *Eco*RI ،*Not*I و *Xba*I ما بين GAL٤ و VP١٦ افزوده

Archive of SID

www.SID.ir

شد تا امكان كلون كردن توالي هاي مختلف در جهت مشخص را فراهم آورد.

جهت شناسايي پروتئازهاي جديد كتابخانه نوكلئوتيدي با استفاده از محل هاي كلونينگ ايجاد شده بين توالي هاي كد كننده GAL٤ و VP١٦ در پلاسميد pcG٤VP١٦ يا pcDBHZGmV قرار داده مي شود. سپس سلول ها در حضور GCV انتخاب مي شوند. بديهي است در سلول‌هايي كه پروتئين GAL٤-VP١٦ فاقد سوبسترا براي اندوپروتئازهاي سيتوپلاسمي است، به دليل عدم هضم آنزيمي، پروتئين مزبور به صورت متصل به هم فعال باقي مي ماند و باعث بيان HSV.tk-Zeo و نهايتاً بروز حساسيت در سلول ها مي شود. سلول هاي مزبور به دليل حساسيت به GCV، در حضور اين دارو از بين مي روند. در حالي كه سلول هايي كه پروتئين GAL٤-VP١٦ بيان شده در آنها محتوي سوبستراي مناسب براي پروتئازهاي سيتوپلاسمي است، تحت تأثير آنزيم هاي سيتوپلاسمي قرار مي گيرد و GAL٤ از VP١٦ جدا مي شود. جدا شدن پروتئين منجر به غير فعال شدن آن و در نتيجه عدم بيان HSV.tk-Zeo و مقاومت به GCV مي شود. بالطبع سلول هاي مزبور به دليل مقاومت به GCV، در حضور اين دارو به رشد خود ادامه خواهند داد، در حالي كه سلول هاي نوع اول از بين خواهند رفت. اين فعل و انفعالات با بروز كلوني در ظرف كشت ظاهر مي شود. جهت شناسايي توالي اسيد آمينه هايي كه توسط پروتئازها شكسته مي شوند، سلول هاي مزبور تكثير داده شده و با استفاده از RT-PCR توالي مزبور مشخص مي شود. با كلون كردن توالي هاي شناخته شده و مشخص درون پلاسميدهاي اين سيستم، از آن براي بررسي وجود پروتئازهاي شناخته شده در بافت هاي مختلف نيز مي توان استفاده كرد.

References

1. Dunn B. A taste test for proteases. Nat. Biotech. 2000; 18 (Feb): 149-150.
2. Yewdwll J W. Not Such a Dismal Science: The Economics of Protein Synthesis, Folding, Degradation and Antigen Processing. Trends in Cell Biol. 2001; 11(17): 294-297.
3. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. Physiol Rev. 2004; 84(2): 579-621.
4. Gabazza EC, Taguchi O, Kamada H, Hayashi T, Adachi Y, Suzuki K. Progress in the Understanding of Protease-activated Receptors. International J of Hematology. 2004; 79(2):117-22.
5. Bahou WF. Protease-activated Receptors. Curr Topics in Devel Biol. 2003; 54:343-69.
6. Vierling P, Greiner J. Prodrugs of HIV Protease Inhibitors. Curr Pharmaceutical Design. 2003; 9(22):1755-70.
7. Zeldin RK, Petruschke RA. Pharmacological and Therapeutic Properties of Ritonavir-boosted Protease Inhibitor Therapy in HIV-infected Patients. J Antimicrobial Chemotherapy. 2004; 53(1):4-9.
8. Thronberry N A, Bull H G, Calaycay J R, Chapman K T, Howard A D, Kostura M J, Miller D K, Molineaux S M, Weidner J R, Aunins J, Elliston K O, Ayala J M, Casano F J, Chin J, Ding G J F, Egger L A,Gaffney E P, Limjuco G, Palyha O C, Raju S M, Rolando A M, Salley J P, Yamin T T , Lee T D, Shively J E, MacCross M, Mumford R A, Schmidt J A, Tocci M J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1β processing in monocytes. Nature, 1992; 356(6372): 768-774.
9. Young P R, Hazuda D J, Simon P L. J. Cell Biol. 1988; 107 (August): 447-456.
10. Calmels, T., Parriche, M., Burand, H. and Tairaby G. High Efficiency Transformation of Tolypocladium geodes Conidiospores to Phleomycin Resistance. Cur Genetics. 1991; 20: 309-314.
11. Drocourt, D, Calmels T P G, Reynes J P, Baron M and Tiraby G. Cassettes of the Streptoalloteichus hindustanus ble Gene for Transformation of Lower and Higher Eukaryotes to Phleomycin Resistance. Nucleic Acids Res. 1990; 18(13): 4009
12. Gatignol A, Baron M Tiraby G. Phleomycin Resistance Encoded by the ble Gene from Trasposon Tn5 as a Dominant selectable marker in Saccharomyces cerevisiae. Mol General Genetics. 1987; 207: 342-348.
13. Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J and Perret J. Phleomycin Resistance as a Dominant Selectable Marker for Plant Cell Transformation. Plant Mol Biol. 1989; 13: 365-373.
14. Mulsant P, Tiraby G, Kallerhoff J and Perret J. Phleomycin Resistance as a Dominant Selectable Marker in CHO Cells. Som Cell Mol Genetics. 1988; 14: 243-252.
15. Sadowski I, Brendan B, Peter Broad, Melvyn Hollis. GAL4 Fusion Vectors for expression in Yeast or Mammalian Cells. Gene. 1992; 118: 137-141.
16. Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an Unusually Potent Transcriptional Activator. Nature. 1988; 335: 563-564.
17. Kuiper M. Sanches R. Gaken J A. Bignon Y. Cloning and Characterization of Retroviral Plasmid, pCCI, for Combination Suicide Gene Therapy. Bio-Techniques. 2000; 28 (March): 572-576.

Archive of SID

www.SID.ir

18. Caruso M. Gene Therapy Against Cancer and HIV Infection Using HSV.tk Gene. Mol. Med. Today, 1996 (2): 212-215.
19. Moolten F L. Drug Sensitivity (Suicide) Genes for Selective Cancer Chemotherapy. Cancer Gene Ther. 1994; 1: 279-287.
20. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immun Meth. 1983; 65: 55-63.
21. Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell Growth/cell Kill. J Immu Meth. 1989; 119: 203-210.
22. Green L M, Read J L, Ware C F. Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the quantification of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines. J Immun Meth. 1984; 70: 257-263.
23. Deniziot F, Lang R. Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. J Immun Meth. 1986; 89: 271-275.
24. Heeg K, Reimann J, Kabelitz D, Hardt C, Wagner H. A Rapid Colorimetric Assay for the Detection of IL-2-Producing Helper T Cell Frequencies. J Immun Meth. 1985; 77: 237-242.
25. Berg K, Hansen M B, Nielsen S E. A New Sensitive Bioassay for Precise Quantification of Interferon Activity as Measured Via the Mitochondorial Dehydrogenase Function in Cells (MTT-Method). APMIS. 1990; 98(2): 156-162
26. Triezenberg S J, Kingsbury R C, McKnight S L. Functional dissection of VP16, the Trans-activator of Herpes Simplex Virus Immediate Early Gene Expression. Genes Deve. 1988; 2: 718-729.
27. Stringer K F, Ingles C J, Greenblatt J. Loss of Serum Response Element-binding Activity and Hyperphosphorylation of Serum Response Factor During Cellular Aging. Nature. 1990; 345: 783-786.
28. Ma J, Ptashne M. Deletion Analysis of GAL4 Defines two Transcriptional Activating Segments. Cell. 1987; 48(5): 847-853.
29. Keegan L, Gill G, Ptashne M. Separation of DNA Binding from the Transcription-activating Function of a Eukaryotic Regulatory Protein. Science. 1986; 231: 699-704.

Archive of SID

www.SID.ir