استفاده از باکتریوفاژ لامبدا به‌عنوان حامل آپوپتین جهت رسانش موثر آن به درون تومور BT-474 سرطان سینه انسانی

نرمین قادری[1*]
خسرو عیسی‌زاده[1]
علیرضا شعاع‌حسنی[2]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان، ایران.
۲- گروه بافت‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، بلوار دانشجو، میدان یاسمن، خیابان عدالت، پلاک ۳.
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۱۶۱۴۱
E-mail: narminghaderi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۰۷ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۳ آنلاین: ۱۳۹۲/۱۰/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتین، پروتیینی از ویروس آنمی مرغ، عامل القای آپوپتوز به‌طور اختصاصی در سلول‌های سرطانی بوده و به سلول‌های سالم آسیبی نمی‌رساند. باکتریوفاژها نظیر فاژ لامبدا را می‌توان تغییر داد تا کاست‌های ژنتیکی را به درون تومورهای سلول‌های یوکاریوتی برسانند و آن‌ها را به‌شکل ایمن بیان کنند. این مقاله روشی ایمن برای بیان آپوپتین توسط فاژ لامبدا در تومورهای سرطانی انسانی ارایه نموده است.

روش بررسی: این مقاله، مطالعه‌ای تجربی است. کلون حامل ژن آپوپتین تهیه و سپس به درون حامل ژنی ZAP-CMV توسط آنزیم‌های تحدیدی *BamH1* و *HinD-III* وارد گردید و با میزبانی باکتری *اشریشیا کلی* به درون فاژ لامبدا بسته‌بندی گردید. این ساختار نوترکیب جهت بیان پروتیین آپوپتین در سلول‌ها به روش‌های RT-PCR و Western Blot بررسی گردید و عملکرد آپوتین در سلول سرطانی BT-474 جهت ممانعت از رشد تومور حاصل از آن در موش‌های Nude مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: ترانسفکت نمودن سلول سرطان سینه توسط فاژ لامبدا که حامل آپوپتین-λZAP-CMV بود، از رشد سلول سرطانی در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری نمود و هیچ اثری بر سلول‌های سالم نداشت. بیان این پروتیین در تومور موشی نیز دیده شد و باعث زنده ماندن موش‌های توموری شد. نفوذ فاژ حامل آپوپتین به درون سلول سرطانی بسیار بالا بود و ترانسفکت نمودن پلاسمید حامل آپوپتین به‌طور مستقیم تاثیر کمی در توقف رشد این سلول داشت.

نتیجه‌گیری: باکتریوفاژ لامبدا حاملی بی‌خطر بوده و آپوپتین به‌طور کاملا اختصاصی قادر به از بین بردن تومورهای سرطانی در بدن موجود زنده می‌باشد. چنین ساختاری روشی بسیار مطمئن برای درمان سرطان در انسان خواهد بود.

کلمات کلیدی: باکتریوفاژ لامبدا، آپوپتین، رسانش، تومور، موش Nude.

مقدمه

آپوپتوز در بسیاری از سلول‌های انسانی به‌وقوع می‌پیوندد تا جلوی توموری شدن سلول‌ها را بگیرد از طرفی چنین مکانیسمی در شیمی‌درمانی برای از بین بردن سلول‌های بدخیم بسیار مهم است. پروتیین آپوپتین، قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های ملانوما، هپاتوما، لنفوما، کولانژیوکارسینوما، کارسینومای روده‌ای و سرطان ریه می‌باشد.[1-3]

دلیل نام‌گذاری آپوپتین به این خاطر است که این پروتیین قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های توموری انسان است. آپوپتین پروتیینی با ۱۲۱ اسید آمینه می‌باشد که از ویروس آنمی مرغ (CAV) به‌دست آمده است.[4و5] این ویروس یکی‌از کوچک‌ترین ویروس‌های مرغ است که در سلول‌های سالم قادر به رشد نمی‌باشد. ژنوم این ویروس سه پروتیین را کد می‌نماید (VP1-3)[6] که VP3 را آپوپتین می‌نامند.[5] فعالیت آپوپتوزی آن با توانایی قرارگیری در هسته‌ی سلول مرتبط است ولی در سلول‌های طبیعی این پروتیین در سیتوپلاسم باقی

Archive of SID
www.SID.ir

می‌ماند و وارد هسته نمی‌شود.[۷و۸] امکان وارد ساختن ژن آپوپتین در وکتورهای مختلفی نظیر ویروس‌های پاپیلوما، پاروو، پولیوما و آدنو[۹و۱۰] موجب شده تا این پروتیین برای درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد. به‌منظور استفاده از آپوپتین در درمان سرطان، رسانش و بیان کارآمد آن به درون سلول‌های سرطانی بسیار مهم است.

باکتریوفاژها تنها قادر به آلوده‌سازی باکتری‌ها می‌باشند.[۱۱] این عوامل به‌شدت اختصاصی بوده و هر یک از آن‌ها قادر به آلوده‌سازی تنها یک سویه‌ی خاص از باکتری می‌باشد. لامبدا (λ) فاژی است معتدل با ژنوم DNA دو رشته‌ای (۵۰ kb~) و از گلیکوپروتیین‌های E و D که پوشش آن هستند تشکیل شده است.[۱۲] با تشکیل ۴۰۰ کپی از گلیکوپروتیین D، کپسید شکل می‌گیرد.[۱۳] باکتریوفاژ لامبدا دارای ظرفیت تکثیر و درجه پایداری بالا، فرآیند تولید سریع و ارزان‌قیمت و ایمنی زیستی در سلول‌های انسانی می‌باشند.[۱۴و۱۵] باکتریوفاژها را به‌عنوان وکتوری ضعیف به‌منظور رسانش ژن در سلول‌های انسانی می‌شناختند[۱۶] اما ساخت وکتورهای فاژمیدی، دست‌کاری آن‌ها را آسان ساخت.[۱۷]

فاژدرمانی زمینه‌ای جالب و کاربردی در درمان سرطان می‌باشد ولی اطلاعات اندکی در مورد بیان ژن‌ها به‌واسطه‌ی فاژها در سلول‌های یوکاریوتی در دسترس می‌باشد.[۱۸] به‌همین دلیل مطالعات ما بیان آپوپتین به‌واسطه‌ی باکتریوفاژ لامبدا را در رده سلولی یوکاریوتی از نوع رده سلولی BT-474 سرطان سینه انسانی و تومور حاصل از آن در موش‌های Nude را هدف قرار داده است.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران و با همکاری گروه علوم سلولی کاربردی دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت.

محیط کشت و سویه‌ها: باکتری (Pasture Institute, Tehran, Iran) *Escherichia coli* DH5α به‌عنوان میزبان فاژی جهت تیتراسیون و تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. محیط (Sigma-Aldrich, USA) Luria-Bertani (LB) به‌منظور انتخاب فاژهای ترانسفورم شده به‌کار گرفته شد. محیط M9 (Supplemented with ampicillin and IPTG) برای الکتروپوریشن مورد استفاده قرار گرفت. ژن آپوپتین، هدیه‌ای از دانشکده Leiden هلند بود.

سلول‌ها و کشت سلولی: رده‌های سلولی سرطان سینه (BT-474, MDA-MB-361, SKBR-3, UACC-812 and ZR-75) (Pasture Institute, Tehran, Iran) و سلول‌های بنیادی اندومتریوم انسانی (Lonza Clonetics, USA) در محیط کامل RPMI 1640 (Invitrogen, USA) و DMEM/F12 (Gibco, UK) که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS, Gibco, UK) بود در ۳۷ °C و پنج درصد $5CO_2$ کشت داده شدند.

تکثیر و کلونینگ ژن آپوپتین: پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن آپوپتین، از روی توالی‌های GeneBank (NC-001427) طراحی شد و توسط (Cinnagen Inc, Tehran, Iran) سنتز گردید. سایز محصولی که انتظار می‌رفت ۳۹۶ bp بود. مخلوط واکنش PCR حاوی $MgCl_2$ ۲ mM، dNTPs ۲۰۰ mM و ۲۰ pmol از پرایمرها بود. Taq پلیمراز (۱ unit; Promega, USA) و DNA ۵ ng الگو در نهایت به حجم کلی ۲۵ µl رسید. واکنش در یک ترموسایکلر اتوماتیک (Peq Lab, Germany) با سه دقیقه زمان دناتوراسیون اولیه (۹۴ °C)، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به‌مدت یک دقیقه، به‌منظور جداسازی دو رشته و سپس اتصال پرایمر به رشته، دمای ۶۰ °C به‌مدت یک دقیقه در نظر گرفته شد، طویل شدن در دمای ۷۵ °C به‌مدت یک دقیقه و طویل‌سازی پایانی در دمای ۷۲ °C به‌مدت پنج دقیقه بود. محصول خالص به‌دست‌آمده از PCR توسط Kit extraction-gel (QIAex II, Qiagen) جدا شد. آپوپتین به‌دست آمده از PCR طبق دستورالعمل شرکت سازنده به درون pCR2.1 کلون گردید (Invitrogen, USA). پلاسمیدها به‌روش الکتروپوریشن به *E. coli* DH5 α انتقال داده شدند. cDNA آپوپتین که به وکتور pCR2.1 کلون شده بود توسط هضم آنزیمی محدودکننده و توالی‌یابی DNA تأیید گردید. قطعه‌ی داخل‌شده به pCR2.1 توسط آنزیم محدودکننده *BamH-I* و *HinD-III* درون بافر تانگو آزاد شد و از ژل خالص گردید (دمای ۴ °C، ۱۲ ساعت). قطعه یادشده به درون وکتور بیانی λZAP-CMV (Stratagene, USA) وسط همین برش آنزیمی افزوده شد و توسط 2U از T4 DNA لیگاز (Fermentas, USA) و µl ۰/۵ از ۱۰ mM ATP (Invitrogen, USA) لیگاسیون انجام شد. سپس به DH5α وارد شد و همان‌طور که پیش‌از این شرح داده شده بود

Archive of SID
www.SID.ir

برای جداسازی تک‌کلنی‌ها کشت داده شد.[۱۹] طویل‌سازی در دمای ۴۲ °C به‌مدت چهار ساعت انجام پذیرفت. کشت در محیط حاوی آمپی‌سیلین صورت گرفت و انتخاب تک‌کلنی با استفاده از نوک پیپت پاستور انجام شد.

نوترکیب سازی ذره فاژی: به‌منظور تولید فاژ لامبدای نوترکیب، *E. coli* DH5α با یک MOI از فاژها (Lambda, Nanjing, China) تلقیح گردید و بعد از دو ساعت انکوباسیون در ۳۷ °C با ۱۰ µg آپوپتین–λZAP–CMV الکتروپوریته (Electroporation) (ایجاد منفذ با جریان الکتریکی) شد. وکتور بیانی آپوپتین–λZAP-CMV به این مخلوط اضافه گردید. به این‌صورت که لوله‌ی حاوی آپوپتین–λZAP-CMV در دمای اتاق به مدت دو ساعت انکوبه شد. ۱ ml از بافر فاژی {حاوی: ۵/۶ g NaCl، ۲/۰ g $MgSO_4$، ۷ H_2O، (۷/۵ -M Tris ۲٪ (w/v) in ۱۱ distilled water}، ۵۰/۰ ml ۱/۰ HCl (pH gelatin ۵/۰ ml به این لوله اضافه گردید. بعد از این مرحله، ۲۰ µl کلروفروم (Sigma, USA) به مخلوط اضافه شد و با مابقی مواد درون لوله به‌طور کامل مخلوط گردید. این لوله به‌طور مداوم چرخانده شده و محلول رویی حاوی فاژ برای تیتراسیون آماده شد. فاژ از طریق کشت دادن DH5α روی پلیت آگار (Gibco, USA) براساس دستور مربوطه (شرکت تولیدکننده) تیتر گردید. مقدار زیادی از فاژ λ حاوی وکتور بیانی آپوپتین–λZAP-CMV به یک لیتر از محیط M9 حاوی آمپی‌سیلین وارد شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط با اضافه نمودن یک میلی مول IPTG القا گردید و ۷۲ ساعت انکوبه شد. کشت القاشده با دور ۸۵۰۰ به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاژ موجود در این عصاره از طریق کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شد. در نهایت یک کلون از این فاژها جهت بیان ژن آپوپتین انتخاب گردید.

مطالعات بیان آزمایشگاهی: رده‌های سلولی BT-474، MDA-MB-361، SKBR-3، UACC-812 و ZR-75 انسانی در دو محیط کامل RPMI-1640 (BT-474, SKBR-3, ZR-75) و DMEM (MDA-MB-361, UACC-812) در فلاسک‌های ۷۵ کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت به ۸۰٪ تراکم رسیدند. سلول‌های اندومتریوم انسانی کشت داده شده در DMEM/F12 بعد از گذشت ۳۶ ساعت به‌چنین تراکمی می‌رسیدند لذا آن‌ها زودتر کشت داده شدند. رقت‌های فاژی سریالی از 10^{-8} M تا 10^{-12} M در بافر کلسیم آماده شدند (۲ mM $Cacl_2$، ۱۵۰ mM NaCl، ۱۰ mM HEPES، ۳ mM NaN_3، pH ۷). سلول‌های تک‌لایه‌ای از پلیت‌ها برداشته شده، به میکروتیوب‌ها انتقال داده شدند و سپس نانوزیست ذرات لامبدای حاوی کاست آپوپتین–λZAP-CMV بدان تلقیح گردید. سپس مواد داخل میکروتیوب به‌خوبی با هم مخلوط شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شدند. سپس مخلوط در پلیت‌های شش‌خانه‌ای حاوی ۵٪ FBS همان‌طور که پیش‌از این توضیح داد شد، کشت داده شدند. بعد از چهار ساعت انکوباسیون، محیط اطراف سلول را برداشته و بدان محیط تازه اضافه شد. پس‌از گذشت ۴۸ ساعت، محیط را به‌طور کامل حذف نموده؛ از این سلول‌ها برای آنالیز وسترن بلات، RT-PCR و آنالیز سیتوشیمیایی استفاده شد.

شناسایی آپوپتین پس‌از رسانش با فاژ نوترکیب توسط RT-PCR: سلول‌های میزبان ترانسفکت شده دو بار توسط PBS شسته شدند و RNA تام با استفاده از کیت استخراج RNeasy (Qiagen, Germany) با توجه به دستور مربوطه استخراج گردید.[۲۰] یک میکروگرم از RNA تام برطبق دستور شرکت سازنده توسط آنزیم ترنسکریپتاز سوپراسکریپت ریورس (Invitrogen, USA) به cDNA رونویسی شد. به‌منظور آنالیز RT-PCR، ۵ µg از RNA کل با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز MMLV (Promega, USA) رونویسی معکوس شد. RNA معادل cDNA (۵۰۰ ng)، با استفاده از Taq DNA پلیمراز با ۳۰ چرخه تحت شرایط ذیل تکثیر داده شد:

پنج دقیقه ۹۵ °C، ۳۰ ثانیه ۵۵ °C و یک دقیقه ۷۲ °C. محصول PCR به روی ژل آگاروز ۱٪ که حاوی اتیدیوم بروماید بود انتقال داده شد و با Gel Doc، عکس‌های مورد نیاز از آن گرفته شد.

آنالیز وسترن بلات به‌منظور شناسایی آپوپتین: ۳۶ ساعت بعد از ترنسفکت نمودن سلول‌ها توسط نانوزیست ذره‌ی لامبدای نوترکیب، همان‌طور که قبل‌تر توضیح داده شد، این سلول‌ها طبق پروتکل‌های قبلی مورد آنالیز لکه‌گذاری قرار می‌گیرند.[۲۱]

سلول‌ها را با بافر فسفات شست و شو داده و سپس آن‌را به ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده ۵۰ mM Tris، pH ۷/۴، ۲۵۰ mM NaCl، ۵ mM EDTA، ۰/۱٪ Triton X-100، ۲۰ mM β-glycerophosphate، ۱ mM phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride، ۲۰۰ mg/ml trypsin inhibitor انتقال داده، در یک میکروتیوب ریخته و به‌مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار می‌گیرد. نمونه‌ها در بافر نمونه (۵۰ mM Tris، pH ۷/۴، ۲٪ SDS، ۱۰۰ mM dithiothreitol، ۰/۱٪ bromophenol blue،

Archive of SID

www.SID.ir

glycerol ۱۰٪) به‌مدت پنج دقیقه جوشانده شده و باقی‌مانده سلول‌ها را با سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در چهار درجه، به‌مدت ۱۰ دقیقه) جداسازی می‌شوند. نمونه‌ها روی SDS PAGE ۱۰٪ با آنتی‌بادی آنتی‌آپوپتین پلی‌کلونال موشی با هم ترکیب شده و واکنش دادند، در ادامه به‌همراه آنتی‌بادی ثانویه ضدآنتی‌بادی موش که با HRP کونژوگه شده، به‌مدت دو ساعت انکوبه گردید. از آپوپتین خالص به‌عنوان کنترل مثبت و سلول‌های ترانسفکت‌نشده به‌عنوان کنترل منفی و β-Actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

اثر ضد نئوپلاستیکی فاژ نوترکیب: اثر آپوپتین در سلول‌های ترانسفکت‌شده توسط فاژ نوترکیب نیز مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها را روی لام کشت داده شده و پس‌از پر شدن با نانوزیست ذرات نوترکیب ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت پس‌از آن، سلول‌ها توسط پروپیدیوم یدید (PI) رنگ‌آمیزی شدند. این سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. در صورت نارنجی شدن سلول‌ها روند آپوپتوزی در آن‌ها رخ می‌دهد و سلول‌های زنده به رنگ سبز دیده می‌شوند.

آزمون رنگ‌سنجی MTT:

سنجش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide, Sigma, USA) به‌منظور پیدا شدن قابلیت حیاتی سلول‌ها بعد از انتقال نانوساختارهای نوترکیب انجام پذیرفت. تمام انواع سلول‌های میزبان یک‌روز قبل‌از انتقال با نانوزیست ذرات لامبدای نوترکیب در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شدند.

قابلیت حیاتی سلول در طول ۷۲ ساعت و هر ۱۲ ساعت یک‌بار توسط ۲۰ میکرولیتر MTT چک شد و آن‌ها به‌مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند تا اجازه متابولیزاسیون به MTT داده شود. سپس محیط کشت تخلیه شده و کریستال‌های ایجاد شده با اضافه نمودن ۱۰۰ µl دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO, Merck, Germany) برای هر خانه، حل گردیدند. میزان جذب در ۴۹۰ نانومتر توسط الایزاخوان اندازه‌گیری شد. سلول‌های تیمارنشده به‌عنوان کنترل مد نظر قرار گرفتند.

آزمایش در شرایط محیط زنده: در این آزمایش از ۳۲ سر موش Nude استفاده شد. به ۲۷ سر از موش‌ها سلول‌های BT-474 تلقیح گردید. البته قبل‌از تلقیح قرص‌های حاوی استروژن در زیر پوست این موش‌ها کاشته شده بود. پنج عدد از موش‌ها به‌عنوان کنترل منفی تحت شرایط یکسان با موش‌های تلقیحی نگه‌داری شدند. پس‌از تومورزایی، این موش‌ها به سه دسته تقسیم شدند و به گروه اول باکتریوفاژهای نوترکیب حامل آپوپتین تزریق گردید. به گروه دوم باکتریوفاژهای معمولی تزریق شد و به گروه سوم تنها فسفات بافر سالین تزریق گردید. این تزریق به‌مدت دوبار در هفته تا مدت زمان ۹۰ روز در موش‌هایی که زنده بودند ادامه یافت. وزن این موش‌ها و اندازه تومور موجود در آن‌ها نیز هفته‌ای دوبار به‌صورت مرتب اندازه‌گیری شد.

حجم این تومور به‌صورت (طول× ضخامت^2× ۰/۵۲) محاسبه شد. در این تحقیق از Student's t-test جهت بررسی معنادار بودن نتایج سنجش رنگی MTT استفاده شد. تفاوت‌های آماری قابل توجه را با استفاده از آنالیز Student's t-test و تکرار مقادیر را با نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۹ بررسی نمودیم. تمام $P<0/05$ معنادار در نظر گرفته شدند.

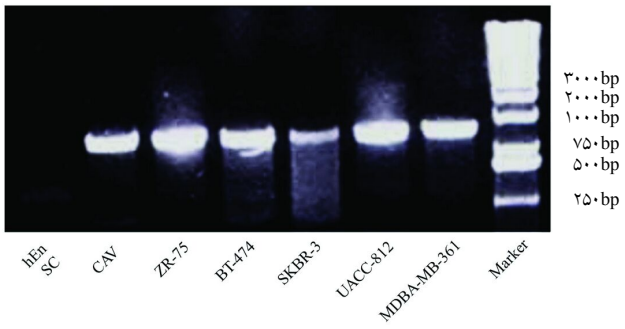
یافته‌ها

تولید باکتریوفاژ بیان کنندهٔ آپوپتین: به‌منظور تولید فاژ لامبدای بیان‌کننده آپوپتین، این ژن به درون پلاسمید نوترکیب λZAP-CMV وارد گردید. الگوی هضم اندونوکلئاز محدودکننده نشان داد که آپوپتین به‌درستی به درون وکتور وارد شده است. پس‌از این مرحله پلاسمید نوترکیب آپوپتین-λZAP-CMV به درون فاژ لامبدا توسط کیت بسته‌بندی وارد گردید و بعد از آن به رده سلولی کارسینومای BT-474 منتقل شد.

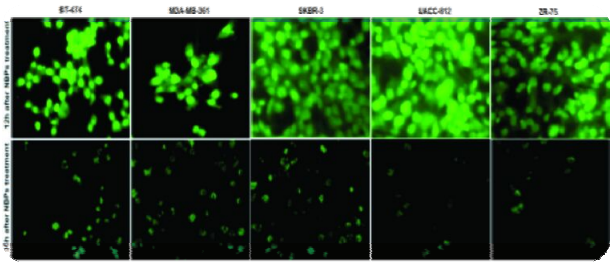
بیان پروتیین آپوپتین درون این رده سلولی سنجیده شد و نتایج RT-PCR (شکل ۱) و وسترن بلات (شکل ۲) این امر را تایید نمود. در نهایت این باکتریوفاژ نوترکیب به موش‌های Nude دارای تومور BT-474 انسانی تلقیح شد که نتایج بسیار مثبتی را در پیش‌گیری از رشد بیش‌تر تومور، کاهش اندازه تومور و زنده نگه‌داشتن موش‌ها نشان داد (شکل ۳ و ۴).

تولید mRNA آپوپتین در سلول کارسینومایی مورد مطالعه مشاهده شد. سلول بنیادی حاصل از بافت اندومتریوم که به‌عنوان کنترل استفاده شد میزان پایینی از رونویسی آپوپتین را از خود نشان داد (شکل ۱). در آنالیز وسترن بلات، سلول کارسینومایی BT-474،

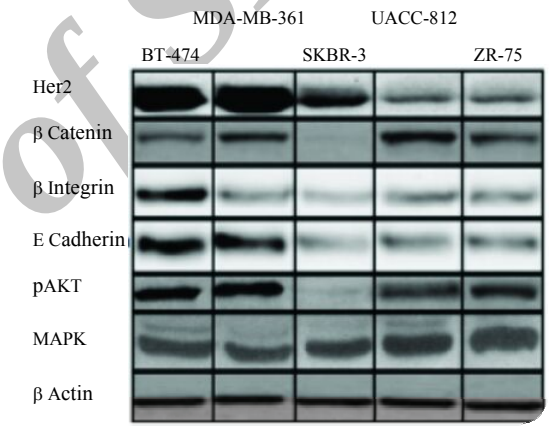
Archive of SID
www.SID.ir



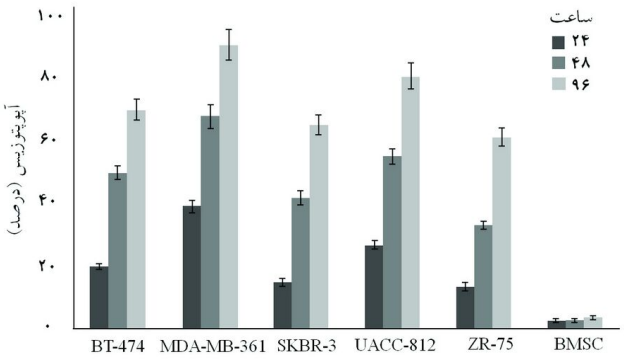
شکل ۱: آنالیز RT-PCR از بیان ژن آپوپتین درون رده BT-474 سرطان سینه انسان. هیچ بیانی در سلول‌های بنیادی اندومتریوم انسانی دیده نمی‌شود.



شکل ۳: رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت پروپیدیوم یدید در سلول‌های ترانسفکت شده با ساختار باکتریوفاژی بیان‌کننده آپوپتین. بیان هسته‌ای آپوپتین و تغییرات مورفولوژیکی در اثر آپوپتوزیس پس‌از ۴۸ ساعت در قسمت پایین دیده می‌شود و سلول‌هایی که هنوز قادر به بیان آپوپتین و استقرار هسته‌ای آن نیستند تنها ۱۲ ساعت پس‌از تیمار در ردیف بالا مشاهده می‌شود.



شکل ۲: آنالیز وسترن بلات از بیان پروتیین آپوپتین درون رده‌های BT-474 سرطان سینه انسان. از بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد و از سلول BT ترانسفکت نشده نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.



شکل ۴: بررسی قابلیت حیاتی سلول‌ها پس‌از ترانسفکت نمودن با ساختار فاژ لامبدای نوترکیب. تیمار پس‌از ۹۶ ساعت نشان‌دهنده مرگ سلول‌های سرطانی به‌طور معنادار بود.

آپوپتین را بیان نمود، BT-474 ترانسفکت نشده که به‌عنوان کنترل منفی قرار گرفته بود چنین حالتی نداشت. هم‌چنین سلول بنیادی کنترل هم میزان بسیار پایینی از بیان آپوپتین را داشت (شکل ۲).

اثر ضد نئوپلاستیکی آپوپتین حاصل‌از رسانش باکتریوفاژ لامبدا: اثر ضد نئوپلاستیکی آپوپتین بیان شده توسط باکتریوفاژ لامبدا با بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول بیان‌کننده‌ی آن مشخص گردید. این روش بیان آپوپتین و جای‌گیری درون سلولی آن را در سلول‌های هدف مشخص ساخت (شکل ۳). رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت با استفاده از آنتی‌سرم‌پلی‌کلونال در سلول‌های ترانسفکت‌شده با باکتریوفاژ لامبدای بیان‌کننده آپوپتین، بیان هسته‌ای آپوپتین و تغییرات مورفولوژیکی در اثر آپوپتوزیس، را نشان داد (شکل ۳). این مطالعه به‌صورت آشکارا مشخص ساخت که آپوپتین توسط باکتریوفاژ لامبدای نوترکیب که حامل آپوپتین-λZAP-CMV است، بیان می‌شود. چنین تغییراتی در سلول‌های تیمار شده‌ی EnSC توسط ساختار لامبدای نوترکیب مشاهده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

قابلیت حیاتی سلول‌ها پس‌از تیمار توسط باکتریوفاژ نوترکیب: روش رنگ‌سنجی MTT برای بررسی قابلیت حیاتی سلول‌ها پس‌از ترانسفکت نمودن با باکتریوفاژ لامبدای نوترکیب اجرا شد. زمانی که سلول‌ها تیمار شدند بعد از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت تا میزان ۲۰٪ از رشدشان کاسته شد و پس‌از ۴۸ ساعت ۵۰٪ از سلول‌ها دیگر رشدی نداشتند. پس‌از ۹۶ ساعت از گذشت تیمار با باکتریوفاژ نوترکیب لامبدا ۷۰٪ سلول‌ها از بین رفتند (شکل ۴). همان‌طور که انتظار می‌رفت با گذشت مدت زمان بیش‌تر از ترانسفکت نمودن، تکثیر سلول‌ها و حیات آن‌ها متوقف می‌شد (شکل ۴). در مقابل، باکتریوفاژ نوترکیب تأثیری بر قابلیت حیاتی EnSCs نداشت. تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در رشد رده سلولی تیمار شده با فاژ وحشی لامبدا مشاهده نشد.

بررسی مدل حیوانی اثر ضد سرطانی باکتریوفاژ نوترکیب: جهت بررسی قابلیت ساختار باکتریوفاژی نوترکیب، تزریق به ورید دمی موش Nude توموری شده توسط BT-474 صورت گرفت. نتایج مشخص نمود که این فاژ نوترکیب به‌میزان قابل‌ملاحظه‌ای از اندازه تومورها کاست تا جایی‌که پس‌از ۳۰ روز اندازه تومور به‌طور معنادار حتی به $۵۰mm^۲$ هم نرسید و این در صورتی بود که پس‌از گذشت همین مدت زمانی اندازه تومور تا $mm^۲$ ۳۵۰۰ ثبت شد. گروه تیمار شده با فاژ معمولی نیز تغییری در اندازه تومور نشان نمی‌داد. هم‌چنین این فاژ نوترکیب جلوی مرگ حتمی را در این مدل به‌طور کامل معناداری گرفت. به‌طوری‌که پس‌از سه ماه اندازه‌گیری مداوم تومور در موش‌های زنده مانده که با ذرات باکتریوفاژ نوترکیب لامبدا تیمار شده بودند نرخ زنده بودن به ۶۰٪ رسید و این در حالی بود که در موش‌های گروه تیمار نشده و تیمار شده با فاژ معمولی تنها ۱۵٪ از موش‌های Nude تا ۶۰ روز زنده ماندند و آن‌هم در حالی بود که اندازه تومور درونی موش‌ها متجاوز از $mm^۲$ ۳۵۰۰ بود.

بحث

این تحقیق به بررسی رسانش یک پروتیین ضدسرطانی ویروسی آن هم توسط یک باکتریوفاژ پرداخته شد. سلول سرطانی BT-474 از نوع سرطان سینه انسانی هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* که با پروتیین آپوپتین درون فاژ لامبدای نوترکیب مورد تیمار قرار گرفته بود، بررسی شد. این باکتریوفاژ لامبدا که برای اولین‌بار توسط گروه تحقیقاتی ما طراحی شد به‌صورت انتخابی بر روی سلول سرطانی تأثیرگذار بوده و هیچ اثر ممانعت‌کنندگی بر روی سلول‌های سالم ندارد.

آپوپتین پروتیینی ضدسرطانی است که به‌تازگی کشف شده و پتانسیل بسیار بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد.[۷و۸و۲۲] این پروتیین مسیر کلاسیک آپوپتوز را القا می‌نماید[۲۳] ولی در سلول‌های اولیه، درون سیتوپلاسم باقی می‌ماند و این در حالی است که در سلول‌های سرطانی به هسته نفوذ کرده و آپوپتوز را از مسیر میتوکندریایی القا می‌نماید.[۲۴] با این وجود سیستم‌های کارآمدی نیاز است تا آپوپتین را به سلول سرطانی برساند و یا کاست ژنی آن درون این سلول‌ها بیان شود. پیشنهاد ما برای این رسانش و بیان استفاده از یک باکتریوفاژ لامبدا بود. در این تحقیق، ساختار و خصوصیات یک باکتریوفاژ لامبدای نوترکیب برای رسانش ژن آپوپتین و بیان آن در سلول‌های BT-474 سرطان سینه‌ی انسانی آن‌هم در شرایط درون تنی توسط گروه تحقیقاتی ما گزارش شده است.

استفاده از باکتریوفاژ برای درمان سرطان تاکنون توسط دانشمندان زیادی گزارش شده است. به‌عنوان مثال در سال ۱۹۹۸، دانشمندان از باکتریوفاژ به‌عنوان حامل پپتیدی برای نفوذ به درون تومور استفاده نمودند. هم‌چنین دوکسوروبسین را که یک داروی ضدسرطانی است متصل به فاژ در تیمار ضدسرطانی سلول‌های سرطانی سینه انسان مورد استفاده قرار دادند و این باکتریوفاژ بود که کارآیی آن دارو را افزایش داد.[۲۵] در مطالعه‌ای دیگر میزان نابودی سلول‌های سرطانی ملانوما با اتصال به E-selectin با استفاده از باکتریوفاژهای رشته‌ای مهندسی شده، افزایش یافت.[۲۶] در سال ۲۰۰۸، نیز گروهی از دانشمندان باکتریوفاژهای فیلامنتی را طراحی نمودند که با هیگرومایسین پر شده بود و فعالیت سمی علیه بافت‌های توموری داشت.[۲۷] Shoae-Hassani جهت تولید و رسانش نانوبادی هدف‌مند علیه شاخص Her-II سلول‌های سرطان سینه از نوع SKBR-3 از باکتریوفاژ لامبدا استفاده نمود.[۱۸]

همان‌طور که توضیح داده شد، فاژهای رشته‌ای برای نمایش فاژی و وکتورهای رسانش ژن به‌مقدار زیادی به‌کار برده شدند ولی گزارشات اندکی مبنی‌بر استفاده از باکتریوفاژ لامبدا برای این منظور وجود دارد. در اینجا از باکتریوفاژ معتدل لامبدا جهت رسانش و بیان

Archive of SID
www.SID.ir

پروتیین آپوپتین برای توقف رشد سلول‌های سرطانی در بدن موجود زنده استفاده شد.

باکتریوفاژ لامبدای طراحی‌شده توسط گروه ما که قادر به کد نمودن ژن آپوپتین بود، پس‌از ورود به درون سلول میزبان این قدرت را یافت تا سنتز mRNA را در هسته‌ی سلول‌های سرطانی انجام دهد و این پروتیین را به‌شکل کارآمدی در سلول‌های سرطانی انسان بیان کند. در سال ۲۰۰۷، دانشمندان سلول‌های ملانوما را با فاژهای مهندسی‌شده، تیمار نمودند که قادر به تجمع درون سلول میزبان یوکاریوتی بودند و برخی ژن‌ها را نیز بیان می‌نمودند.[۲۸] همین‌طور در آزمایش ما نیز باکتریوفاژهای حامل ژن آپوپتین قادر بودند آن‌را به رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه انسان برسانند که در آنجا فرم عملکردی این پروتیین بیان می‌شد. این روند در درون بدن موش‌های Nude هم دیده شد و میزان رشد تومور را تا مقدار زیادی کاست و میزان مرگ‌ومیر را در آن‌ها به شدت کاهش داد. این روش و رویکرد بر پایه‌ی فعالیت اختصاصی علیه تومور جهت درمان سرطان غیرمعمول می‌باشد. جالب است که باکتریوفاژ نوترکیب لامبدا برای سلول‌های سرطانی هدفمند نشده بود ولی بیان اندکی در سلول‌های نرمال داشت. آپوپتوز تنها در سلول‌های سرطانی القا می‌شد و دلیل این امر، جای‌گیری درون سلولی متفاوت پروتیین آپوپتین در سلول‌های سرطانی و سالم بود. در سلول‌های طبیعی آپوپتین اغلب در سیتوپلاسم جای گرفته اما در سلول‌های سرطانی وارد هسته می‌شود.[۷و۸]

با وجود آن‌که آپوپتین به‌صورت انتخابی مرگ را در رده‌های سلولی BT-474 القا نمود، در مقابل، سلول‌های طبیعی EnSC هیچ‌گونه فعالیت آپوپتوزی از خود نشان ندادند و همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شد، قابلیت حیاتی سلول سرطانی تیمار شده با باکتریوفاژ حامل آپوپتین-λZAP-CMV به‌شکل قابل‌ملاحظه‌ای در مقایسه با سلول‌های سالم کاهش نشان می‌داد (P≤۰/۰۵). تاکنون هیچ‌گونه گزارشی مبنی‌بر استفاده از باکتروفاژ لامبدا جهت رسانش و بیان آپوپتین در دسترس نبوده ولی برخی گروه‌ها از آدنوویروس‌ها برای انتقال این عامل و در نتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های کلانژیوکارسینومای استفاده کرده‌اند.[۲۹] هم‌چنین گزارشی موجود است که در آن تکثیر وکتورهای آدنوویروسی بیان‌کننده آپوپتین، اثرات ضدتوموری خوبی بر روی زنوگرافت هپاتوما نشان دادند و در برخی موارد این هپاتوما به‌طور کامل برگشت داشت.[۳۰]

انتخابی عمل نمودن آپوپتین برای سلول‌های توموری و بیانش توسط باکتریوفاژ نوترکیب لامبدا آن‌را برای درمان سیستمیک بسیار مناسب نموده است و نیازی به هدف‌مندسازی آن نیز وجود ندارد. چراکه این ساختار دارای خاصیت درمانی بر روی موش‌های Nude توموری می‌باشد. از همین‌رو چنین ساختاری که قابلیت تکثیر فراوان و ارزان در میزبان پروکاریوتی را دارد در صورت تولید، قیمتی بسیار مناسب داشته و از این‌رو برای درمان ترجیح داده خواهد شد.

این گزارش بیان‌گر حمل و رسانش موفق ژن آپوپتین توسط باکتریوفاژ لامبدا و بیان موثر آن درون سلول‌های یوکاریوتی می‌باشد. این حامل باکتریوفاژی قادر به بیان آپوپتین با قابلیت عملکرد مناسب بوده و عامل القای ایمن و بی‌خطر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی آن‌هم بدون هدف‌مندسازی می‌باشد. اختصاصی بودن پروتیین آپوپتین و قرار دادن آن در وکتورهای ارزان‌قیمتی نظیر باکتریوفاژ لامبدا با قدرت تکثیر فراوان در یک میزبان باکتریایی مناسب و با رشد فراوان، آن‌را به منبعی مناسب و مقرون به‌صرفه جهت درمان سرطان معرفی می‌کند.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل همکاری صمیمانه آقای دکتر علیرضا شعاع حسنی در مرکز علوم و تحقیقات در پزشکی دانشگاه تهران می‌باشد.

References

1. Leliveld SR, Zhang YH, Rohn JL, Noteborn MH, Abrahams JP. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. *J Biol Chem* 2003;278(11):9042-51.
2. Tavassoli M, Guelen L, Luxon BA, Gäken J. Apoptin: specific killer of tumor cells? *Apoptosis* 2005;10(4):717-24.
3. Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, Zimmerman R, Visser M, Voskamp P, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008; 48:143-69.
4. Noteborn MH, de Boer GF, van Roozelaar DJ, Karreman C, Kranenburg O, Vos JG, et al. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *J Virol* 1991;65(6):3131-9.
5. Noteborn MH, Koch G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol* 1995;24(1):11-31.

Archive of SID
www.SID.ir

6. Meehan BM, Todd D, Creelan JL, Earle JA, Hoey EM, McNulty MS. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch Virol* 1992;124(3-4):301-19.
7. Danen-Van Oorschot AA, Zhang YH, Leliveld SR, Rohn JL, Seelen MC, Bolk MW, et al. Importance of nuclear localization of apoptin for tumor-specific induction of apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(30):27729-36.
8. Oro C, Jans DA. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus. *Curr Drug Targets* 2004;5(2): 179-90.
9. Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, Voorhoeve M, Rommelaere J, Noteborn MH, et al. Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 2001;8(12):958-65.
10. van der Eb MM, Pietersen AM, Speetjens FM, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Noteborn MH, et al. Gene therapy with apoptin induces regression of xenografted human hepatomas. *Cancer Gene Ther* 2002;9(1):53-61.
11. Ackermann HW. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch Virol* 2001;146(5):843-57.
12. Murialdo H, Ray PN. Model for arrangement of minor structural proteins in head of bacteriophage lambda. *Nature* 1975;257(5529): 815-7.
13. Sternberg N, Weisberg R. Packaging of coliphage lambda DNA. II. The role of the gene D protein. *J Mol Biol* 1977;117(3):733-59.
14. Jepson CD, March JB. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine* 2004;22(19):2413-9.
15. Lankes HA, Zanghi CN, Santos K, Capella C, Duke CM, Dewhurst S. In vivo gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors. *J Appl Microbiol* 2007;102(5):1337-49.
16. Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ, editors. Phage Display: A Laboratory Manual. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
17. Larocca D, Jensen-Pergakes K, Burg MA, Baird A. Receptor-targeted gene delivery using multivalent phagemid particles. *Mol Ther* 2001;3(4):476-84.
18. Shoae-Hassani A, Mortazavi-Tabatabaei SA, Sharif S, Madadi S, Rezaei-Khaligh H, Verdi J. Recombinant λ bacteriophage displaying nanobody towards third domain of HER-2 epitope inhibits proliferation of breast carcinoma SKBR-3 cell line. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2013;61(1):75-83.
19. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.
20. Yousefi B, Ghaderi S, Rezapoor-Lactooyi A, Amiri N, Verdi J, Shoae-Hassani A. Hydroxy decenoic acid down regulates gtfB and gtfC expression and prevents Streptococcus mutans adherence to the cell surfaces. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012;11:21.
21. Hassani AS, Amirmozafari N, Ghaemi A. Virulence increasing of Salmonella typhimurium in Balb/c mice after heat-stress induction of phage shock protein A. *Curr Microbiol* 2009;59(4):446-50.
22. Gdynia G, Lehmann-Koch J, Sieber S, Tagscherer KE, Fassl A, Zentgraf H, et al. BLOC1S2 interacts with the HIPPI protein and sensitizes NCH89 glioblastoma cells to apoptosis. *Apoptosis* 2008; 13(3):437-47.
23. Danen-van Oorschot AA, van Der Eb AJ, Noteborn MH. The chicken anemia virus-derived protein apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *J Virol* 2000;74(15):7072-8.
24. Danen-Van Oorschot AA, Fischer DF, Grimbergen JM, Klein B, Zhuang S, Falkenburg JH, et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(11):5843-7.
25. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; 279(5349):377-80.
26. Fukuda MN, Ohyama C, Lowitz K, Matsuo O, Pasqualini R, Ruoslahti E, et al. A peptide mimic of E-selectin ligand inhibits sialyl Lewis X-dependent lung colonization of tumor cells. *Cancer Res* 2000;60(2):450-6.
27. Bar H, Yacoby I, Benhar I. Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC Biotechnol* 2008;8:37.
28. Eriksson F, Culp WD, Massey R, Egevad L, Garland D, Persson MA, et al. Tumor specific phage particles promote tumor regression in a mouse melanoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5):677-87.
29. Pederson LC, Vickers SM, Buchsbaum DJ, Kancharla SR, Mayo MS, Curiel DT, et al. Combined cytosine deaminase expression, 5-fluorocytosine exposure, and radiotherapy increases cytotoxicity to cholangiocarcinoma cells. *J Gastrointest Surg* 1998;2(3):283-91.
30. Pietersen AM, Rutjes SA, van Tongeren J, Vogels R, Wesseling JG, Noteborn MH. The tumor-selective viral protein apoptin effectively kills human biliary tract cancer cells. *J Mol Med (Berl)* 2004; 82(1):56-63.

Archive of SID

www.SID.ir

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, February 2014; Vol. 71, No. 11: 691-699 *Original Article*

Utilization of Lambda bacteriophage as an Apoptin effective delivery platform to the BT-474 human breast carcinoma

Narmin Ghaderi M.Sc.[1*]
Khosro Esazadeh Ph.D.[1]
Alireza Shoae Hasani Ph.D.[2]

1- Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University Lahijan Branch, Gilan, Iran.
2- Department of Stem Cell and Tissue Engineering, Research Center for Science and Technology in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: No. 3, Edalat St, Yasaman Sq., Daneshjoo Blvd., Velenjak, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22416141
E-mail: narminghaderi@yahoo.com

Abstract

Received: 28 May. 2013 Accepted: 04 Nov. 2013 Available online: 01 Jan. 2014

Background: Apoptin is a protein from chicken anemia virus that could induce apoptosis specifically in the cancer cells but it has not any effect in the normal cells. Phage therapy is a novel field of cancer therapy and phage nanobioparticles (NBPs) such as λ phage could be modified to deliver and express genetic cassettes into eukaryotic cells safely in contrast with animal viruses. The bacteriophages like Lambda could be manipulated to deliver genetic cassettes into eukaryotic cells and express the gene safely. We developed the safe way for the expression of Apoptin gene via Lambda bacteriophage in the human tumors.

Methods: At first the Apoptin clone was produced and then transferred into ZAP-CMV plasmid through *BamH-I* and *HinD-III* restriction sites. Then this construct inserted into the Lambda phage in the *Escherichia coli* host cell. The expression of Apoptin in the recombinant construct was evaluated via RT-PCR and Western Blot analysis. The anti tumor function of expressed protein was measured in the BT-474 cells that was hosted by nude mice.

Results: Transfection of breast carcinoma cells by Lambda bacteriophage containing λZAP-Apoptin-CMV was inhibited the tumor growth significantly but did not any effect on normal cells. The expression of this protein was very high in tumor cells and prevented the death of tumor bearing nude mice. The penetration and spreading of Apoptin construct by bacteriophage Lambda was significantly high but the Apoptin plasmid had very little expression in BT-474 cell, directly. Transfection with NBPs carrying λZAP-CMV-Apoptin significantly inhibited growth of all the breast carcinoma cell lines *in vitro*, but had no effect on normal cells.

Conclusion: Utilization of recombinant Lambda bacteriophage as a safe expression vector has been confirmed. Apoptin was induced apoptosis specifically in the tumors *in vivo*. Use of such construct is a very safe way to treat cancer in human. The results presented here reveal important features of λ nanobioparticles to serve as safe delivery and expression platform for human cancer therapy.

Keywords: apoptin, bacteriophage lambda, delivery, neoplasms, nude mice.

Archive of SID

www.SID.ir