Archive of SID

Original Article

Identification of Novel Targeting Peptides for PC3 Cells by the Screening of a Phage Display Peptide Library

Saeedeh Ghiasvand[1], Fatemeh Rahbarizadeh[2], Majid Sadeghizadeh[3*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: 24/Dec/2014, Accepted: 14/Jan/2015

Abstract

Objective: Prostate cancer is the second cause of cancer-associated death in men. In recent years, targeted therapy for cancer has attracted the attention of researchers. Targeted therapy leads to a decrease in drug adverse effects. Studies indicate that targeting peptides for cancer cells represent valuable tools for diagnostics and therapeutics. Recently, phage display peptide libraries have been used to identify target peptides to a variety of cancer cells. In the current study, we aim to isolate peptides that target PC3 cells (human prostate adenocarcinoma cells).

Methods: Four rounds of subtractive panning on control cells that included 5637 (bladder), Huh-7 (liver), SW480 (colon), AGS (stomach) and human fibroblast normal in addition to four rounds of positive panning on PC3 (target cell) were performed. Polyclonal phage ELISA was used to evaluate the process of enrichment during biopanning. Subsequently, phage clones were randomly selected from titer plates, amplified by plaque-PCR, and their genomic DNA was sequenced. We conducted bioinformatic analysis for further characterization of the isolated peptides.

Results: Several rounds of panning resulted in the enrichment of a number of peptides. The results of polyclonal phage ELISA indicated that the biopanning process was successful. In silico analysis showed the presence of several consensus amino acid motifs in the peptides.

Conclusion: The peptides identified through biopanning can be considered as potential specific binders to PC3 cells. Peptides with specificity binding to target cells can be used for targeted gene and drug delivery to malignant tumor cells. Further analyses of these peptides are required to show their capacity for targeted delivery of various genes and drugs into prostate cancer cells.

Keywords: Phage peptide library, Biopanning, Targeting peptide, Prostate cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 69-83

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله اصیل

شناسایی پپتیدهای جدید هدف‌گیری کنندهٔ سلول‌های آدنوکارسینومای پروستات (PC3 Cell line) با استفاده از کتابخانهٔ نمایش فاژی پپتیدی

سعیده قیاسوند[1]، فاطمه رهبری زاده[2]، مجید صادقی زاده[3*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۰۳ پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: سرطان پروستات دومین سرطان مرگ آور پس از سرطان ریه در مردان است. در سال‌های اخیر درمان هدفمند سرطان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این امر موجب می‌شود عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو به حداقل برسد. مطالعات نشان داده است که پپتیدهای هدف‌گیری کنندهٔ سلول‌های سرطان قابلیت استفاده به‌عنوان ابزارهای درمانی و تشخیصی هدفمند را دارند. اخیراً کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی برای شناسایی پپتیدهای هدف‌گیری کنندهٔ به‌کار گرفته شده‌است. هدف از این تحقیق جداسازی پپتیدهای هدف‌گیری کنندهٔ سلول‌های PC3 به‌عنوان نشانگری هدفمند برای شناسایی سرطان پروستات بود.

مواد و روش‌ها: ٤ دور غنی‌سازی مثبت روی سلول‌های PC3 (سلول هدف) و ٤ دور غنی‌سازی منفی روی سلول‌های کنترل شامل فیبروبلاست، AGS، SW480، 5637 و Huh-7 انجام شد. پلی‌کلونال فاژ الایزا برای ارزیابی روند غنی‌سازی انجام شد. سپس ژنوم تعدادی از فاژهای جداسازی شده در مراحل آخر غنی‌سازی با انجام PCR روی پلاک‌های به‌دست آمده، تکثیر و تعیین توالی شد. مطالعات بیوانفورماتیکی برای بررسی‌های بیشتر انجام شد.

نتایج: چندین دور غنی‌سازی کتابخانهٔ فاژی منجر به غنی‌سازی تعدادی پپتید شد. نتایج پلی‌کلونال فاز الایزا موفقیت‌آمیز بودن روند غنی‌سازی را تأیید کرد. همچنین بررسی‌های بیوانفورماتیکی توالی‌های به‌دست آمده چند دنبالهٔ آمینواسیدی مشترک را نشان داد.

نتیجه‌گیری: پپتیدهای جداسازی شده طی فرآیند غنی‌سازی را می‌توان نشانگری اختصاصی برای سلول‌های سرطانی پروستات PC3 در نظر گرفت. توالی های پپتیدی با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول هدف را می‌توان برای هدایت هدفمند ژن و دارو به سلول‌های بدخیم پروستات استفاده نمود. تحقیقات بیشتری برای بررسی قابلیت ورود هدفمند این پپتیدها برای انتقال دارو یا ژن‌های سرکوبگر تومور به داخل سلول‌های سرطانی پروستات باید انجام شود.

کلیدواژگان: کتابخانه نمایش فاژی، غنی‌سازی، پپتیدهای هدف‌گیری کننده، سرطان پروستات

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۶۹-۸۳

مقدمه

پروستات به شکل غده‌ای کوچک در زیر مثانه و در بالای مجرای ادراری قرار گرفته است. در کشورهای توسعه یافته سرطان پروستات دومین سرطان رایج پس از سرطان پوست و دومین سرطان مرگ آور پس از سرطان ریه در مردان است. از

www.SID.ir

Archive of SID

هر شش مرد یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است که عامل‌های توارثی در بروز ۱۰ درصد از این بیماری نقش دارد [۱، ۲]. بیشترین فراوانی سرطان پروستات در آفریقا و کمترین میزان شیوع آن در آسیا مشاهده می‌شود. اکثر تومورهای پروستات آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) هستند که خصوصیات مشترک زیادی با سرطان‌های رایج اپیتلیال مانند سرطان پستان و روده دارند [۳]. سرطان پروستات به‌عنوان دومین علت شایع مرگ و میر در اثر سرطان در مردان یک مسئله مهم به شمار می‌رود. مطالعهٔ مربوط به نخستین گزارش شیوع سرطان در تهران سرطان پروستات را دومین سرطان شایع در مردان معرفی می‌کند [٤].

اولین راه برای تشخیص سرطان پروستات معاینهٔ غدهٔ پروستات توسط معاینهٔ انگشتی رکتوم (Digital rectal examination) از الگوهای غربالگری سرطان پروستات است. در این روش پزشک از طریق مقعد، غدهٔ پروستات را معاینه می‌کند، وجود سطح خشن و نامنظم بافت از علایم هشدار دهندهٔ سرطان پروستات محسوب می‌شود. تومورهای سرطان پروستات پادگن‌های مشخصی را تولید می‌کند که ممکن است با آزمایش خون کشف شود. در حال حاضر تشخیص بر پایهٔ آزمون‌های هیستوپاتولوژیکی یا نمونه‌های سیتولوژی از غدهٔ پروستات است [٥]. جدی‌ترین عارضه پس از بیوپسی از پروستات عفونت (Sepsis) است. تشخیص سریع سرطان پروستات با اندازه‌گیری آنتی‌ژن ویژهٔ پروستات (Prostate Specific Antigen: PSA) از آزمایش‌های غربالگری این بیماری است. در بیمارانی که به سرطان پروستات مبتلا هستند مقدار این آنتی‌ژن در سطح بالاتری است. شایان ذکر است که تنها سطح بالای PSA در آزمایش خون فرد، نمایانگر ابتلا به سرطان پروستات نیست. در برخی از موارد عفونت یا بزرگی خوش‌خیم حجم غدهٔ پروستات می‌تواند سبب افزایش PSA در خون شود. ترکیب معاینهٔ مقعد توام با تعیین سطح PSA خون روش دقیق‌تری برای تشخیص سرطان پروستات است. نتایج مطالعات اخیر نشان داده‌است که افزایش میزان PSA نشانگری اختصاصی برای سرطان پروستات محسوب نمی‌شود. زیرا در حالت طبیعی با افزایش سن میزان PSA طبیعی در مردان افزایش می‌یابد. همچنین همان‌طور که قبلاً هم ذکر شد در عفونت پروستات، خوش‌خیمی پروستات، در انزال و در ناراحتی‌های روانی و خشم میزان PSA افزایش می‌یابد [٦-٨]. که می‌تواند موجب نتیجه تشخیصی مثبت کاذب (False positive) شود. برعکس در برخی افراد مبتلا به سرطان پروستات دیده شده است که سطح PSA نسبت به افراد طبیعی تغییر نیافته یا حتی کاهش یافته است که این امر آزمون‌های تشخیص سرطان بر اساس اندازهٔ PSA را دچار مشکل می‌کند و باعث نتیجهٔ منفی کاذب (False negative) می‌شود [۹].

به‌طور کلی در حال حاضر، جراحی، رادیوتراپی، شیمی درمانی و هورمون درمانی به‌عنوان روش‌های اصلی برای درمان سرطان پروستات محسوب می‌شوند که متأسفانه هیچ یک از این روش‌های درمانی قابلیت درمانی صد درصد ندارد. بنابراین یافتن شیوه‌های درمانی جدید خصوصاً استراتژی‌های برای هدفمند نمودن درمان سرطان پروستات که موجب افزایش کارآیی روش‌های درمانی و کاهش عوارض جانبی ناشی از روش‌های درمانی غیر اختصاصی می‌شود ضروری به‌نظر می‌رسد. تاکنون نشانگرهای ایده‌آلی برای سرطان پروستات و اهداف آن برای رسانش هدفمند داروها شناسایی نشده است. داروهای پپتیدی به‌علت اندازهٔ کوچک و قابلیت نفوذ بالا به بافت‌ها، ایمنی‌زایی کم گزینه‌های مناسبی در زمینه فارماکولوژی محسوب می‌شود. اتصال این ذرات پپتیدی به داروهای ضد سرطانی موجب افزایش اختصاصیت در رسانش دارو به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی و در نتیجه اختصاصیت درمان می‌شود [۱۰-۱۳].

در سال‌های اخیر درمان هدفمند (Targeted therapy) سرطان بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هدف این شیوه درمانی آن است که داروی مورد استفاده تنها وارد سلول‌های سرطانی شده و بافت‌های سالم را تحت تأثیر قرار ندهد. این امر موجب می‌شود عوارض جانبی (Side effects) ناشی از

www.SID.ir

Archive of SID

مصرف دارو به حداقل برسد. عمده روش‌هایی که در حال حاضر برای درمان سرطان استفاده می‌شود، هدفمند نیست و بر همین اساس کاربرد آن‌ها موجب بروز مشکلات بسیار زیادی برای بیماران مبتلا می‌شود. این مسئله بیانگر اهمیت "رسانش هدفمند وابسته به لیگاند (Ligand-mediated targeted delivery)" داروها به سلول‌های سرطانی است؛ هدفی که در صورت تحقق آن شاهد پیشرفت چشمگیر و قابل توجهی در افزایش کارآمدی داروهای مورد استفاده برای درمان سرطان خواهیم بود [١٤].

داروهای پپتیدی به‌علت اندازهٔ کوچک و قابلیت نفوذ بالا به بافت‌ها و ایمنی‌زایی کم گزینه‌های مناسبی در زمینه فارماکولوژی محسوب می‌شود. اتصال این ذرات پپتیدی به داروهای ضد سرطانی موجب افزایش اختصاصیت در رسانش دارو به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی و در نتیجه اختصاصیت درمان می‌شود [١٠، ١١].

کتابخانه‌های نمایش فاژی از جمله ابزارهایی است که برای شناسایی پپتیدهایی که بافت‌ها، تومورها یا پروتئین‌های خاصی را مورد هدف قرار می‌دهند به‌کار گرفته شده‌است. این کتابخانه‌ها ابزارهایی برای غربالگری و شناسایی مولکول‌های دارویی محسوب می‌شود. کتابخانهٔ نمایش فاژی پپتیدی یکی از پرکاربردترین کتابخانه‌های نمایش فاژی است و نسبت به سایر کتابخانه‌های فاژی ایمنی‌زایی کمتر و قابلیت نفوذ بیشتری دارد. در این کتابخانه‌ها انواع بسیار زیادی از پپتیدهای با توالی تصادفی به‌صورت متصل شده با پروتئین پوششی فاژ در سطح فاژ نمایش داده می‌شود. در این کتابخانه‌ها هرکلون فاژی بیان کنندهٔ یک نوع توالی آمینواسیدی منحصر به خود است که در مجموع میلیاردها نوع پپتید در سطح فاژهای یک کتابخانه نمایش داده می‌شود [١٢، ١٣].

نمایش فاژی روشی مولکولی است که در این روش ژن‌ها به‌صورت فرم عملکردی در سطح خارجی باکتریوفاژ از طریق اتصال با پروتئین‌های پوششی ویروس نمایش داده می‌شود. از مزایای روش نمایش فاژی، شناسایی سریع و جداسازی فاژهای دارای اختصاصیت اتصال به هدف مورد مطالعه طی فرآیندی به نام غنی‌سازی (Biopanning) است. غنی‌سازی امکان شناسایی پپتیدهای اختصاصی در محدودهٔ میکرومولار تا نانومولار را موجب می‌شود [١٥، ١٦]. طی غنی‌سازی فاژهای کتابخانه ابتدا با هدف مورد نظر که می‌تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت یا موجود زنده باشد انکوبه می‌شود. سپس فاژهای اتصال نیافته طی مراحل شستشو حذف و فاژهای اتصال یافته پس از مرحلهٔ رهاسازی در میزبان مناسب تکثیر می‌یابند. معمولاً ٣ تا ٥ دور از فرآیند غنی‌سازی برای به‌دست آوردن فاژهای اختصاصی ضروری است. توالی پپتیدها از طریق تعیین توالی DNA هر کلون تعیین می‌شود [١٧-١٩]. فرآیند غنی‌سازی روی سلول‌های سرطانی منجر به جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی می‌شود.

این مطالعه شناسایی و جداسازی فاژ یا فاژهایی از یک کتابخانه فاژی که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول PC3 به‌عنوان سلول توموری پروستات را داشته باشند را بررسی می‌کند. به همین منظور، با استفاده از کتابخانهٔ فاژی هفت پپتیدی طی مراحل غنی‌سازی متعددی فاژهایی که به‌طور اختصاصی به سلول PC3 نسبت به رده‌های سلولی کنترل متصل می‌شود جداسازی و در میزبان مناسب تکثیر و سپس با تعیین توالی شناسایی شد. در نهایت با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مطالعات بیشتری روی توالی‌های پپتیدی جدا شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر پایهٔ تحقیقات آزمایشگاهی و مطالعات بیوانفورماتیک است. در مرحله اول توسط تحقیقات آزمایشگاهی فاژهای که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی پروستات را دارند، غنی‌سازی و در مرحلهٔ بعد با مطالعات بیوانفورماتیک بررسی شدند.

کتابخانه نمایش فاژی و سویه باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی و در واقع مجموعه‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

از فاژهایی است که در سطح فاژ (در پایانهٔ N ژن PIII) پپتیدهای متنوعی بیان می‌شوند در حالی که DNA مربوط به این قطعات در داخل ژنوم قرار دارد، که این یک ارتباط فیزیکی بین پپتید بیان شده و DNA کد کنندهٔ آن به‌وجود می‌آورد. امروزه کتابخانه‌های فاژی به‌صورت تجاری و در انواع مختلفی وجود دارد. در این مطالعه کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی (Ph.D.-7 phage display peptide library) از شرکت New England BioLabs (آمریکا) خریداری شد. این کتابخانه از ناقل فاژی M13KE ساخته شده است. توالی‌های پپتیدی تصادفی هفت اسیدآمینه‌ای که در انتهای آمین پروتئین پوششی pIII کلون شده‌اند پس از بیان در سطح فاژ نمایش داده می‌شوند. کتابخانه‌هایی که با استفاده از فاژ M13KE ساخته شده‌است، پنج ظرفیتی است و هر پنج نسخه پروتئین III موجود در یک ویریون فاژی بالغ، پپتید کلون شده را در سطح خود نمایش می‌دهد. از غربالگری این کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی پروستات PC3 استفاده شد. سویه باکتریایی که به‌عنوان میزبان برای تکثیر فاژهای کتابخانه در مراحل مختلف تحقیق استفاده شد، ER2738 بود. این سویه از باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، دارای پیلوس جنسی (F^+) است و از سرعت رشد بسیار بالایی برخوردار است [۲۰].

کشت رده‌های سلولی

رده‌های سلولی 5637 (آدنوکارسینومای مثانه)، AGS (آدنوکارسینومای معده)، SW480 (آدنوکارسینومای کلون)، HUH7 (کارسینومای کبد) و فیبروبلاست (Fibroblast) به‌عنوان سلول‌های کنترل و PC3 (آدنوکارسینومای پروستات) به‌عنوان سلول هدف از بانک سلولی انیستیتو پاستور خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) و DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (PenSterp) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت سه روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۰/۲۵ درصد، EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۲ درصد پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

غنی‌سازی کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی فاژهای متصل شونده به رده سلولی PC3

غنی‌سازی مهم‌ترین مرحله شناسایی ذرات فاژی هدفمند با استفاده از روش نمایش فاژی است. انجام مراحل متعدد غنی‌سازی و شستشوهای با افزایش زمان و حجم می‌تواند منجر به جداسازی ذرات فاژی با میل پیوندی بالا شود. برای انجام مرحله اول غنی‌سازی، سلول‌ها یک روز قبل از غنی‌سازی تریپسینه و تعداد ۳×۱۰^۵ از سلول‌های کنترل (تعداد مساوی "۶۰ هزار" از هر ردهٔ سلول به‌صورت مخلوط در یک چاهک) و تعداد ۳×۱۰^۵ از سلول‌های PC3 در پلیت‌های ۶ خانه ریخته شدند. در روز بعد محیط سلول‌ها (که تراکم حدود ۹۰ درصد داشت) با محیط فاقد سرم تعویض و یک ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن به‌مدت ۱ ساعت با بافر مسدود کننده PBS+BSA2% در دمای اتاق مسدود شدند. بعد از حذف بافر مسدود کننده یک بار با بافر شستشو (PBS+BSA 1%) شسته و ذرات فاژی به تعداد pfu ۱×۱۰^{۱۱} به سلول‌های کنترل اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت ذرات فاژی که قادر به اتصال به سلول‌های کنترل نبود و در سوسپانسیون رویی قرار داشت با سمپلر از سطح چاهک‌های سلول کنترل جمع‌آوری و به سلول‌های PC3 اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ذرات فاژی که اتصال ضعیف داشت طی شستشو با PBS+BSA1% حذف شد و فاژهای اتصال یافته طی فرآیند لیز سلولی و با افزودن ۰/۸ میلی‌لیتر تری اتیل امین و انکوباسیون به‌مدت ۸

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه و سپس اضافه کردن ۰/۸ میلی‌لیتر، TRIS /HCL ۱ مولار pH=۷/٤ استخراج شد؛ سپس ذرات فاژی تیتر و تکثیر شد. فاژهای تکثیر شده برای انجام دور بعدی غنی‌سازی مطابق با روش انجام شده در دور اول استفاده شد. به همین ترتیب دورهای بعدی غنی‌سازی انجام شد با این تفاوت که در دورهای بعدی تعداد و زمان مراحل شستشو افزایش یافت.

تیتراسیون فاژها

برای تخمین اولیه از تعداد فاژهای تکثیر یافته رقت سریالی از سوسپانسیون فاژی تهیه شد. و هر رقت فاژ به ۲۰۰ میکرولیتر باکتری ER2738 با جذب نوری مناسب در هر تیوب جداگانه اضافه شد و به‌مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا زمان مناسب برای آلودگی باکتری‌ها با فاژها فراهم شود. پس از آن با افزودن ۲ میلی‌لیتر TOP آگاری که از قبل در ماکروویو ذوب شده بود و دمای آن تقریباً ٤۵ درجه سانتی‌گراد بود، مخلوط و روی پلیت‌های LB (Luria Bertani) جامد حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و IPTG/XGAL که یک ساعت قبل از تیتراسیون در انکوباتور گرم شده بود به‌طور یکنواخت پخش شد. تیتر محلول فاژی با شمارش پلاک‌های آبی بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون مشخص شد.

آزمون پلی‌کلونال فاژ الایزا

برای بررسی روند غنی‌سازی، تعداد ۲۰ هزار از سلول‌های PC3 در چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه ریخته شد. روز بعد پس از مسدود نمودن چاهک‌ها با بافر مسدود کننده (PBS/BSA 2%)، ذرات فاژی مراحل مختلف غنی‌سازی به تعداد یکسان (10^{11}Pfu) به هر چاهک افزوده شد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون با تکان دادن و ۳۰ دقیقه انکوباسیون بدون تکان دادن امکان اتصال ذرات فاژی فراهم شد. در مرحلهٔ بعد فاژهای با اتصال ضعیف و غیر اختصاصی طی مرحله شستشو حذف شد. سپس آنتی‌بادی Anti-M13 متصل به HRP (Horseradish peroxidase) اضافه و در نهایت با افزودن TMB (Tetramethylbenzidine) و متوقف نمودن واکنش با اسید سولفوریک ۱۲ نرمال واکنش متوقف و با دستگاه خواننده الایزا جذب در ٤۵۰ نانومتر خوانده شد.

تکثیر و استخراج فاژ

برای تکثیر فاژها کشت شبانهٔ باکتری ER2738 به نسبت ۱ به ۱۰۰ در LB رقیق شد و به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری ER2738 در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. پس از مدتی انکوباسیون زمانی که به مرحله رشد لگاریتمی (تصاعدی) رسید، 1×10^{10} pfu فاژ افزوده شد و به‌مدت ٤/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور همراه با تکان (shake) قرار داده شد. ذرات باکتری با سانتریفوژ در ۳۷۵۰g به‌مدت ۱۵دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد و محلول رویی که حاوی ذرات فاژی است به فالکن جدید منتقل شد. برای رسوب ذرات فاژی، PEG8000-NaCl (محلول ۲۰ درصد حجمی وزنی پلی اتیلن گلیکول در NaCl با غلظت ۲/۵ مولار) به میزان ۱/٦ حجم به محلول حاوی باکتری و فاژ اضافه شد و سپس ۲ ساعت روی یخ قرار داده شد. ذرات فاژی با سانتریفوژ در ۱۸۰۰۰g به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب فاژی به‌دست آمده در یک میلی‌لیتر محلول TBS (Tris Buffered Saline) حاوی ۱۵۰ میلی‌مول NaCl و ۵۰ میلی‌مول Tris با pH= ۷/۵ حل شد. این کار دو بار تکرار می‌شود تا در نهایت تمامی سلول‌های باکتریایی و اجزا باقیمانده آن‌ها حذف شده و تمامی ذرات فاژی موجود در محلول رسوب کند. رسوب را در ۵۰۰ میکرولیتر TBS بافر حل شد. این رسوب حاوی ذرات فاژی است که برای مراحل بعد (تیتراسیون و تعیین توالی) استفاده شد. در نهایت، فاژهای تکثیرشده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یا ۲۰- درجه سانتی‌گراد (با افزودن حجم برابر گلیسرول) نگهداری شد [۲۰].

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر DNA فـاژی، اسـتخراج DNA از ژل و تعیین توالی

محصول فاژی به دست آمده در مرحله بالا به‌عنوان الگـو برای تکثیر ژن PIII فاژ که توالی پپتیدی در ناحیه پایانهٔ N این ژن کلون شده است استفاده شد. واکنش پلیمراز زنجیـره‌ای بـا استفاده از Master mix و آغازگرهای اختصاصی ژن PIII فاژ M13 انجام گرفت. بدین منظور توالی رونوشت ژن مورد نظر از پایگاه اینترنتی NCBI دریافت و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مسـتقیم (Forward primer) و معکـوس (Reverse primer) توسط نرم‌افزار primer express 3 و Oilgo v.7 طراحی شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ خلاصه شده است. واکنش PCR در ۳۵ چرخه انجام شد و مراحل دمایی و زمانی برای واسرشتگی اولیه، واسرشتگی و اتصال آغازگرها و گسترش به‌ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه بهینه شد. کارآیی تکثیر با ژل الکتروفورز بررسی شـد. محصـول PCR بـا اسـتفاده از کیـت اسـتخراج از ژل (GeneAll® DNA Purification، AITbiotech، کره جنوبی) خالص‌سازی شد و تخلیص DNA از ژل مطابق دستور کیـت انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با نانودراپ و ژل آگارز بررسی شد و نمونه‌ها برای تعیین توالی به شـرکت (Bioneer، کره جنوبی) فرستاده شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مـورد اسـتفاده بـرای تکثیـر منطقـه ژنـومی فـاژ M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی کدکننده پپتید نمایش یافته روی سطح فاژ

نوع آغازگر	توالی آغازگر
جلویی	5´- TTTAGTCCTCAAAGCCTCTG - 3´
برگشتی	5´- CAAGCCCAATAGGAACCC - 3´

تجزیه و تحلیل توالی‌های به دست آمده

توالی های نوکلئوتیـدی حاصـل از تعیـین تـوالی توسـط نرم‌افزار آنلاین Emboss -Transeq به توالی پپتیدی ترجمـه شد. پپتیدهای به‌دست آمده با نرم‌افـزار clustal W بـه‌منظـور تعیین درصد هم ردیفی و همولوژی پپتیدها بررسی شد.

نتایج

غنی‌سازی بر روی سلول PC3

مراحل غنی‌سازی، با انجام چهار دور روی سلول‌های مورد مطالعه انجام شد. در نهایت فاژهایی که واجد قابلیت اتصال به سلول PC3 به‌عنوان سـلول‌هـای هـدف مـورد مطالعـه بـود، جداسازی شد. حذف پپتیدهای غیر اختصاصی از نکات مهـم در غنـی‌سـازی اسـت. منظـور از پپتیـدهای غیراختصاصـی، پپتیدهایی است که می‌تواند به سلول‌هایی غیر از سلول هـدف اتصال پیدا کند. بنابراین حذف فاژهای نمایش دهنده پپتیدهای متصل شونده به رده‌هـای سـلولی دیگـر غیـر از سـلول‌هـای پروستات مورد توجه قرار گرفت. به همین منظور غنی‌سـازی منفـی بـرای حـذف فاژهـای نمـایش دهنـده پپتیـدهای غیراختصاصی روی رده‌هـای سـلولی 5637، AGS، SW480، HUH7 و فیبروبلاست به‌عنوان سلول‌های کنترل انجام شـد و غنی‌سازی مثبت بـرای جداسـازی فـاژهـای نمـایش دهنـدهٔ پپتیدهای اختصاصی برای سلول PC3 و به‌عنوان سلول هـدف انجام شد. برای یافتن بهترین کلونی ٤ بار غنی‌سازی تکرار شد و در هر تکرار بـرای افـزایش اختصاصـیت، افـزایش سـختی شرایط غنی‌سازی به‌صـورت افـزایش تعـداد و زمـان مراحـل شستشو انجام شد. این امر موجب می‌شود که فاژهـای دارای میل ترکیبی بالاتر برای اتصال به سلول‌های هدف (PC3) باقی بماند و تعدادشان نسبت به فاژهای با اتصال ضعیف‌تر و میـل ترکیبی کمتر که طی شستشو حذف می‌شود، افزایش یابد.

ارزیابی روند غنی‌سازی با استفاده از تیتراسیون ذرات فاژی قبل و بعد از غنی‌سازی

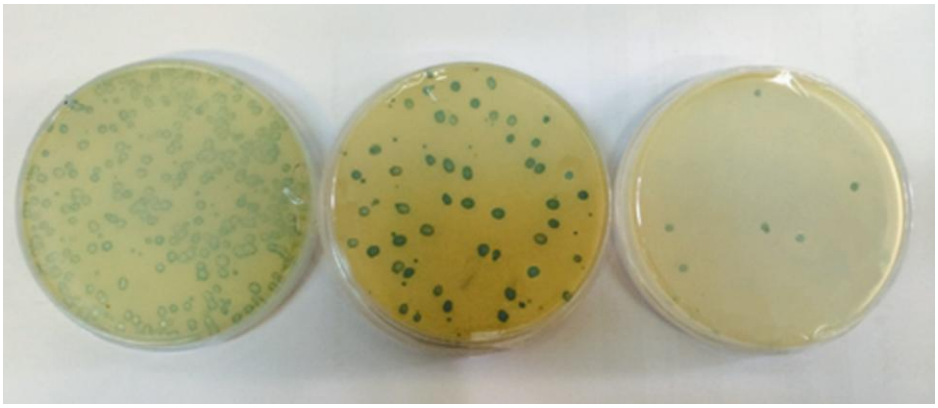
برای ارزیابی چگونگی غنی‌سازی پس از هـر دور تعـداد

www.SID.ir

Archive of SID

ذرات فاژی قبل و بعد از غنی‌سازی محاسبه شد. افزایش تعداد فاژ بعد از هر مرحله در مقایسه با نتیجه غنی‌سازی قبلی دال بر موفقیت در انجام غنی‌سازی بود. بدین منظور از سوسپانسیون فاژی به‌دست آمده در انتهای هر دور غنی‌سازی، رقت‌های سریال تهیه شده و سویه باکتریایی ER2738 با رقت‌های تهیه شده از فاژ آلوده شدند. سپس رقت‌های فاژی بر روی پلیت‌های IPTG-Xgal حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برده شد. فاژهای بازیابی شده به‌صورت پلاک‌های آبی در پلیت قابل مشاهده است (شکل ۱).

نسبت فاژهای ورودی و خروجی درهر مرحله از غنی‌سازی برای تعیین کارآیی غنی‌سازی استفاده شد. این نسبت‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱ تعیین تیتر فاژهای بازیابی شده پس از هر دور غنی‌سازی؛ انتقال رقت‌های مختلف سوسپانسیون فاژی به‌دست آمده پس از هر دور غنی‌سازی روی پلیت‌های IPTG-Xgal موجب پیدایش پلاک‌های آبی رنگ می‌شود. با افزایش رقت سوسپانسیون فاژی تعداد پلاک‌های ظاهر شده روی پلیت‌های IPTG-Xgal کاهش می‌یابد.

جدول ۲ نشان دهندهٔ چگونگی روند غنی‌سازی است.

	PC3		
	تیتر ورودی* (Pfu)	تیتر خروجی** (Pfu)	کارآیی بازیافت (Recovery efficiency)
دور اول	۱×۱۰^{۱۱}	$۱/۶\times۱۰^{۵}$	$۱/۶\times۱۰^{-۶}$
دور دوم	۱×۱۰^{۱۱}	$۹/۴\times۱۰^{۵}$	$۹/۴\times۱۰^{-۶}$
دور سوم	۱×۱۰^{۱۱}	$۷/۲\times۱۰^{۶}$	$۷/۲\times۱۰^{-۵}$
دور چهارم	۱×۱۰^{۱۱}	$۱/۳\times۱۰^{۷}$	$۱/۳\times۱۰^{-۴}$

*: تعداد فاژ اولیه (Input)، **: تعداد فاژ خروجی (Output)

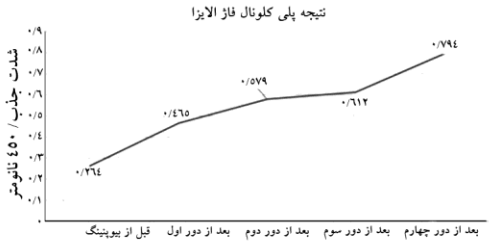
پلی‌کلونال فاژ الایزا برای تأیید موفقیت‌آمیز بودن روند غنی‌سازی

علاوه بر مقایسه تیتر فاژها قبل و بعد از غنی‌سازی، به‌منظور بررسی چگونگی روند غنی‌سازی فاژ الایزا انجام شد. فاژهای جداسازی شده در هر مرحله غنی‌سازی در باکتری ER2738 تکثیر و استخراج شد و تیتراسیون برای تعیین رقت فاژها انجام شد. سلول‌های PC3 تریپسینه با تعداد ۲۰ هزار در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. فاژهای هر دور غنی‌سازی به رقت $۱۰^{۱}$pfu۱ به‌صورت جداگانه به همه سلول‌ها اضافه شد و قابلیت اتصال فاژهای مراحل مختلف غنی‌سازی به سلول‌های PC3 طی واکنش الایزا بررسی شد. افزایش شدت جذب در سلول PC3 در آزمون الایزای انجام شده موفقیت غنی‌سازی روی این سلول‌ها را تأیید نمود (شکل

www.SID.ir

Archive of SID

۲) که با نتایج تیتراسیون نیز همخوانی داشت. (جدول ۲) بر اساس نتایج به‌دست آمده ذرات فاژی حاصل از دور چهارم غنی‌سازی روی سلول‌های PC3 به‌علت داشتن بیشترین شدت جذب برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند.



شکل ۲ بیانگر شدت جذب نوری حاصل از آزمون الایزای انجام شده برای هر کدام از مراحل مختلف غنی‌سازی و نشان دهندهٔ چگونگی روند غنی‌سازی است.

تکثیر DNA فاژی و تعیین توالی نوکلئوتیدی کدکننده پپتیدهای متصل شونده به سلول PC3

کلون‌های فاژی غنی‌سازی شده می‌تواند از طریق تعیین توالی شناسایی شود. به همین منظور سوسپانسیون فاژی به‌دست آمده از دور چهارم روی سلول PC3 به باکتری ER2738 وارد شد و روی پلیت‌های IPTG/XGAL/Tet کشت داده شد. ۳۰ پلاک آبی رنگ از پلیت‌هایی که کمتراز ۱۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شده بود و حداکثر دارای حدود ۱۰۰ پلاک جدا از هم بود و پراکندگی پلاک‌های فاژی در آن‌ها همگن بود انتخاب شد. باید دقت شود که فقط پلاک‌های آبی رنگی که کاملاً مجزا است برداشته شود تا هر پلاک فقط نشان‌دهندهٔ یک مولکول DNA باشد. این امر موجب می‌شود هر پلاکی که انتخاب می‌شود، واجد یک توالی DNA منحصر به فرد باشد. پلیت‌های انتخاب شده نباید بیش از ۱-۳ روز قبل از برداشت پلاک تهیه شده باشد. زمان طولانی موجب کاهش یا از بین رفتن فاژها می‌شود.

از پلاک‌های انتخاب شده به‌عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی و برای ذخیره نمودن استفاده شد. واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با آغازگرهای طراحی شده برای ژن PIII فاژM13 انجام شد و قطعهٔ ۵۵۰ نوکلئوتیدی حاوی ژن پوششی شماره ۳ فاژ و ۲۱ نوکلئوتید کلون شده در آن تکثیر شد. نتیجهٔ تکثیر ژن روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳).

پس از استخراج از ژل با استفاده از کیت Gene All نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده شد.

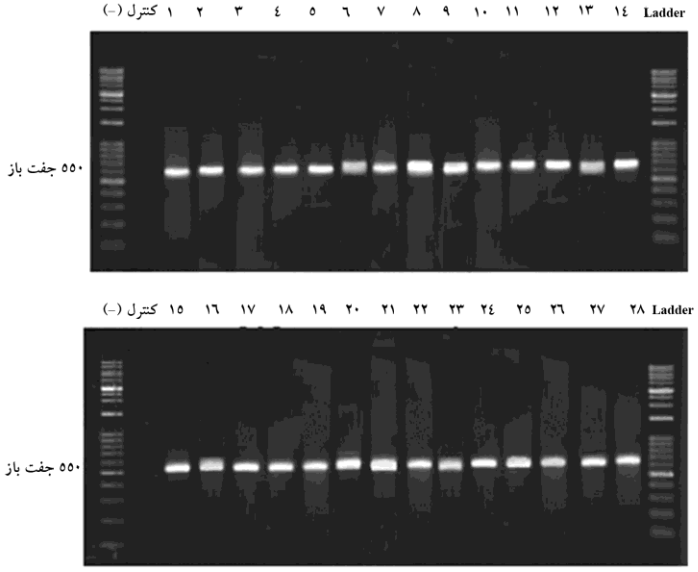
نتیجه تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی

از مقایسه و هم‌ردیفی بین توالی ژنوم فاژ M13KE و توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی پلاک‌های انتخاب شده توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پپتیدهای فیوز شده به ژن شماره III فاژ M13KE را مشخص شد. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی کلون شده در پایانهٔ N ژن شماره III فاژ توسط پایگاه اینترنتی http://web.expasy.org/translate/expacy به توالی پپتیدی ترجمه شد. در نهایت توالی آمینواسیدی پپتیدهای نمایش یافته روی فاژهای حاصل از غربالگری روی سلول‌های مورد مطالعه به‌دست آمد. توالی‌های پپتیدی به‌دست آمده در جدول ۳ قابل مشاهده است. در این جدول توالی پپتیدی و فراوانی هر یک از کلون‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که قابل ملاحظه است غنی‌سازی روی سلول PC3 و نیز رده‌های سلولی کنترل در نهایت منجر به جداسازی ۱۴ نوع توالی پپتیدی شد. پپتید (PC-Pep1 ALQNSGR) و (PC-Pep2 WNAKYTL) از بالاترین فراوانی برخوردار بود و ۷ کلون از ۲۱ کلون فاژی تعیین توالی شده این پپتید را نمایش می‌دهد. پپتید PC-Pep4 (LSNNNLR) و PC-Pep6 (SPSTHWK) نیز با ۲ بار تکرار، از نظر فراوانی در رتبه‌های بعد قرار داشت. ۱۰ کلون فاژی نیز دارای پپتیدهایی بود که از فراوانی ۱ برخوردار بود و در فرآیند غنی‌سازی تکرار نشده بود. به‌طور کلی، فراوانی بالاتر یک پپتید نشانگر غنی‌سازی آن در حین انجام فرآیند غنی‌سازی است. این غنی‌سازی احتمالاً می‌تواند بیانگر میل ترکیبی بالا و اختصاصیت پپتید جداشده در اتصال به ساختار هدف رده‌های سرطانی پروستات باشد. بر این اساس

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان گفت پپتیدهای که از فراوانی بالاتری نسبت بـه سـایر پپتیدهای نمایش یافته بر سطح ذرات فاژی، برخوردار بودند ممکن است که پپتیدهای واجد میل ترکیبی و اختصاصیت بالا در اتصال به PC3 باشد. اما در مورد پپتیدهای دیگر تنها زمانی که تعداد فاژهای بیشتری تعیین توالی شود و در صورت تعداد تکرارهای بیشتر، می‌توان ادعا نمود که اختصاصیت و میل ترکیبی برای اتصال به سلول‌های هدف مورد مطالعه را دارد و بنابراین در این تحقیق برای مطالعات تکمیلی استفاده نشد.



شکل ۳ الکتروفورز باند ۵۵۰ جفت باز حاصل از تکثیر قسمتی از ژنوم فاژ M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی پپتید نمایش یافته روی سـطح فـاژ روی ژل آگـارز یـک درصد؛ اعداد نشان داده شده در شکل، نمایانگر شماره پلاک‌های فاژی به‌دست آمده از دور آخر غنی‌سازی است.

جدول ۳ این جدول توالی پپتیدی و فراوانی فاژهای جداسازی شده طی فرآیند غنی‌سازی روی سلول PC3 را نشان می‌دهد. در این جدول اسـامی کلـون‌هـای فـاژی، اسامی پپتیدهای نمایش یافته توسط کلون‌های فاژی مزبور، توالی آمینواسیدی پپتیدهای جداشده و فراوانی آن‌ها بیان شده است.

	کلون فاژی	نام پپتید	توالی اسیدامینه ای پپتیدها	فراوانی	درصد فراوانی
۱	PC-12، PC-7، PC-26، PC-19	PC-Pep1	ALQNSGR	٤/۲۱	۲۰ درصد
۲	PC-14	PC-Pep2	ALTVSGV	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۳	PC-2، PC-11، PC-16	PC-Pep3	WNAKYTL	۳/۲۱	۱٤ درصد
٤	PC-5، PC-6	PC-Pep4	LSNNNLR	۲/۲۱	۹/۵ درصد
۵	PC-3	PC-Pep5	LPNNNLH	۱/۲۱	٤/۷ درصد
٦	PC-10، PC-28	PC-Pep6	SPSTHWK	۱/۲۱	۹/۵ درصد
۷	PC-22	PC-Pep7	SLAFWEN	۱/۲۱	۹/۵ درصد
۸	PC-23	PC-Pep8	SLAFWEM	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۹	PC-8	PC-Pep9	ESPSTWR	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۱۰	PC-13	PC-Pep10	PYIRTHS	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۱۱	PC-20	PC-Pep11	SHLYFNK	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۱۲	PC-15	PC-Pep12	NERALTL	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۱۳	PC-21	PC-Pep13	TPSPNVT	۱/۲۱	٤/۷ درصد
۱٤	PC-29	PC-Pep14	LSTHVPR	۱/۲۱	٤/۷ درصد

توجه به این امر که غنی شدن یک توالی پپتیدی و افزایش فراوانی آن در میان مجموع پپتیدهای جد اشده در حین فرآیند

www.SID.ir

Archive of SID

غنی‌سازی یکی از نشانه‌هایی است که می‌تواند ما را به اختصاصیت پپتید به‌دست آمده نسبت به سلول‌های هدف رهنمون سازد؛ اما بی‌گمان برای آن که بتوان با اطمینان بیشتری درباره اختصاصیت پپتیدهای جداسازی شده نسبت به سلول هدف بحث کرد، نیاز به انجام مطالعات بیشتری است. این مطالعات می‌تواند در برگیرنده مجموعه‌ای از بررسی‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی باشد.

نتیجهٔ بررسی هم‌ردیفی توالی‌های پپتیدی حاصل از تعیین توالی با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی

تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی همگام با روش‌های آزمایشگاهی در تکنولوژی نمایش فاژی برای شناسایی پپتیدهای اختصاصی به‌کار می‌رود. با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی دنباله‌های مشترک در پپتیدهای جداسازی شده شناسایی می‌شود. همچنین همولوژی بین پپتیدهای جدا شده با توالی های پروتئینی موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی بررسی می‌شود که در نهایت می‌تواند درستی پپتیدهای جدا شده در آزمایشگاه را تأیید نماید. یکی از مهم‌ترین تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی روی پپتیدهای به‌دست آمده از غنی‌سازی شناسایی دنباله‌های آمینواسیدی مشترک (Consensus amino acid motifs) بین توالی‌های پپتیدی مزبور است.

به همین منظور از نرم‌افزار CLUSTAL W برای پیدا کردن دنباله های مشترک بین توالی‌های پپتیدی حاصل از غنی‌سازی استفاده شد.

هم‌ردیفی پپتیدهای حاصل از غنی‌سازی روی سلول PC3 نیز منجر به شناسایی چند دنباله آمینواسیدی مشترک شد. دنباله‌های TV، NW، AFW، TH، S-T-R، A-TL، AL-SG، SPST، PSTN، N-K-L، PSP و NP از دنباله‌های تکراری قابل مشاهده است. وجود دنباله‌های تکراری می‌تواند دلالت بر غنی شدن آن دنباله در حین فرآیند غنی‌سازی داشته و می‌تواند نشان دهنده اختصاصیت دنباله مزبور در اتصال به ساختار هدف باشد. همچنین بررسی درصد و فراوانی هریک از آمینواسیدها (نشان داده نشده است) بیانگر تعداد بالای آمینواسیدهای آسپارژین، لوسین، سرین، ترئونین، تریپتوفان و آلانین در پپتیدهای جداسازی شده است که می تواند دلیلی بر میل ترکیبی و اختصاصیت آن‌ها در اتصال به سلول PC3 باشد. جالب این که در بین ۱۵٤ آمینواسید تشکیل دهندهٔ ۲۲ پپتید هفت آمینواسیدی مورد مطالعه اسید آسپارتیک و سیستئین اصلا دیده نشد. متیونین و اسید گلوتامیک و ایزولوسین هم هر کدام تنها یک بار وجود داشت. این تفاوت بین تکرارهای ۲۰ نوع آمینواسید می‌تواند از طرفی نشان دهندهٔ موفقیت در فرآیند غنی‌سازی باشد و از طرفی هم مربوط به تکرار غیر تصادفی حین سنتز کتابخانهٔ فاژی باشد. از آن‌جا که شرکت NEB (آمریکا) امکان حضور همهٔ آمینواسیدها را با هم برابر می‌داند و ادعا می‌کند که هر کتابخانه از حدود ۲ میلیارد نوع فاژ مستقل تشکیل شده است و در هر موقعیت پپتید کلون شده بدون هیچ‌گونه برتری هریک از آمینواسیدها به‌صورت تصادفی می‌تواند وجود داشته باشد. تنها مورد استثنا حذف پرولین و آمینواسیدهای با بار مثبت از پایانهٔ N پپتید یا پروتئین اتصالی به PIII است؛ پس انتظار می‌رود که عدم برابری و تفاوت بین تکرار آمینواسیدهای مختلف دلیلی بر اختصاصیت اتصال آن‌ها در اتصال به سلول‌های مورد مطالعه باشد.

وجود دنباله‌های آمینواسیدی مشترک در کنار تکرار برخی توالی‌های پپتیدی، بیانگر آنست که فرآیند غنی‌سازی موجب جداسازی کلون‌های فاژی و به تبع آن پپتیدهایی شده است که می‌توان گفت از قابلیت بالقوه بالایی در اتصال به سلول‌های هدف برخوردار است.

بحث

روش نمایش فاژی (Phage display) ابزار مولکولی بسیار قدرتمندی است که برای شناسایی لیگاندهای اختصاصی استفاده می‌شود. در تکنولوژی نمایش فاژی پلی‌پپتیدهای خارجی به‌صورت ژنتیکی در ژن‌های کد کنندهٔ پروتئین‌های پوششی فاژ الحاق شده‌است؛ بنابراین توالی‌های تصادفی پلی‌پپتیدها در سطح ویریون‌های بالغ نمایش داده می‌شود. نمایش در سطح فاژ پلی‌پپتیدها امکان انتخاب بر حسب تمایل (Affinity selection)

www.SID.ir

Archive of SID

با ظرفیت بالا برای جداسازی کلون‌هایی که به هدف مورد نظر متصل می‌شود را فراهم می‌کند. هدف می‌تواند مولکول‌های غیر پروتئینی یا مولکول‌های پروتئینی، آنزیم، گیرنده سطح سلول، اسید نوکلئیک، کربوهیدرات، سلول، اندام یا تومور و ... باشد [۲۱–۲۵]. ارتباط ژنوتیپ– فنوتیپ در تکنولوژی نمایش فاژی ابزارهای مناسب و ساده‌ای برای جداسازی لیگاندها فراهم می‌کند. این روش این امکان را فراهم می‌آورد که بتوان توالی‌های پپتیدی بسیار متنوعی را در سطح فاژ نمایش داد و بدین ترتیب کتابخانه‌های پپتیدی را ساخت [۲۶]. این گونه از کتابخانه‌های فاژی پپتیدی واجد پپتیدهای بسیار متنوعی است و می‌توان پپتیدهایی را که واجد قابلیت اتصال اختصاصی به یک هدف خاص باشد، از آن‌ها جدا نمود. این هدف می‌تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت و ... باشد [۲۷]

در سلول‌های سرطانی پروتئین‌های مختلفی وجود دارد که بیان برخی از آن‌ها در حالتی که سلول سرطانی می‌شود، افزایش می‌یابد و از آن‌ها می‌توان به‌عنوان نشانگرهای سرطان نام برد [۲۸] نشانگرهای توموری که در سطح سلول‌های سرطانی بیان می‌شود، گزینه‌های بهتر و کارآمدتری برای استفاده به‌عنوان اهداف غنی‌سازی برای جداسازی پپتیدهای اختصاصی است. پپتیدهایی که به این پروتئین‌های سطحی متصل می‌شود، این قابلیت را دارد که بتوان از آن‌ها برای تشخیص سلول‌های سرطانی و نیز انتقال هدفمند دارو و ژن استفاده نمود. بنابراین شناسایی پپتیدهای اختصاصی متصل شونده به پروتئین‌های سطحی سلول‌های سرطانی افق دید وسیع‌تری را در زمینه درمان هدفمند (Targeted therapy) و ژن درمانی در پیش روی ما می‌گشاید. در سال‌های اخیر، کاربرد کتابخانه‌های نمایش فاژی نقش بسیار مهمی در گسترش کاربرد روش نمایش فاژی داشته است.

تاکنون در مطالعات متعددی از غربالگری کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای اختصاصی سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان کلون [۲۹] شش [۳۰] گلیوبلاستوما (Glioblastoma) [۳۱] و... استفاده شده است.

در مطالعه‌ای لی (Lee) و همکارانش با استفاده از غنی‌سازی کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی و جداسازی و بازیابی فاژهای اختصاصی سرطان مثانه از رده‌های سلولی سرطان مثانه و تعیین اختصاصیت اتصال این نانوذرات فاژی به‌صورت In vivo و In vitro از این نانوذرات هدف‌گیری کننده برای تشخیص سرطان مثانه در نمونه‌های ادراری افراد مبتلا از سالم استفاده نمودند [۳۲]. ژانگ (Zhang) و همکارانش با غربالگری کتابخانهٔ فاژی پپتیدی هفت آمینواسیدی روی سلول‌های سرطانی کولون موفق به شناسایی پپتیدی به نام cp15 شدند که قادر به اتصال اختصاصی به سلول‌های SW480 و HT29 بود [۳۳].

امروزه یکی از مشکلات بسیار مهم درمان سرطان، عدم اختصاصیت روش‌های درمانی موجود است. عدم انتقال هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی موجب گریزناپذیر شدن استفاده از دوزهای بالای دارو برای رسیدن به غلظت‌های کارآمد و مؤثر درمانی می‌شود که این امر خود باعث افزایش عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضد سرطان می‌شود. بر همین اساس ابداع و طراحی استراتژی‌های کارآمد و مؤثر برای رسانش هدفمند و انتخابی داروها به سلول‌های توموری و در عین حال عدم تأثیر بر سلول‌های طبیعی بدن از اهمیت شایان توجهی در زمینه درمان سرطان برخوردار است. این موارد موجب شده در سال‌های اخیر موضوع درمان هدفمند در حوزه تحقیقات سرطان مورد توجه بسیار قرار گیرد [۳۴].

دستیابی به راه‌های ایمن، ارزان، کارآمد و اختصاصی برای رسانش ژن‌ها و دارو به سلول‌های هدف، افق تازه و جدیدی برای درمان بیماری‌ها است. یکی از جدیدترین رویکردها در این زمینه استفاده از نانوحامل‌های فاژی است که نویدبخش پیدایش نسل جدیدی از ناقل‌های ژنی اختصاصی است. روش نمایش فاژی ابزاری بسیار قدرتمند است که امکان غربالگری با توان بازدهی بالا برای شناسایی و جداسازی لیگاندهای اختصاصی متصل شونده به انواع سلول‌ها و بافت‌ها را فراهم می‌آورد. از

www.SID.ir

Archive of SID

کتابخانه های فاژی پپتیدی که طیف وسیعی از پپتیدهای دارای ویژگی های اتصالی منحصر به فرد را نمایش می‌دهد، می‌توان برای جداسازی و انتخاب لیگاندهای پپتیدی با اختصاصیت و میل ترکیبی بالا نسبت به انواع سلول‌های سرطانی استفاده نمود [۳۵]. یکی از مزایای استفاده از کتابخانه‌های فاژی برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول‌ها و بافت‌های مختلف، عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه و پیشین از گیرنده های موجود در سطح سلول‌های هدف است که مزیت بسیار بزرگی محسوب می‌شود و موجب تسهیل فرآیند شناسایی لیگاندهای هدفمندکننده می‌شود.

سرطان پروستات در مردان دومین علت شایع مرگ و میر در اثر سرطان به شمار می‌رود و از جمله سرطان‌هایی است که با تغییر روش زندگی شیوع آن رو به افزایش است. متأسفانه روش‌های رایج امکان پیش‌بینی و تشخیص به موقع این بیماری را ندارند تاکنون نشانگرهای ایده‌آلی برای شناسایی سرطان پروستات و همچنین برای رسانش هدفمند داروها شناسایی نشده است. شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با سرطان پروستات می‌تواند در توسعهٔ روش‌های تشخیصی و درمانی این بیماری مؤثر باشد. نانو ذرات فاژی پپتیدی که توانایی اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان پروستات را داشته باشد ممکن است قابلیت استفاده به‌عنوان نشانگرهای تشخیصی و حتی درمانی را نیز داشته باشد

در این مطالعه از غربالگری کتابخانه پپتیدی Ph.D.™-7 برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول‌های پروستات استفاده شد. از آن‌جایی که در بین کلون‌های حاصل از غنی‌سازی کتابخانه فاژی روی سلول PC3، کلون‌های فاژی PC-Pep1 و PC-Pep3 دارای تکرار بیشتری هستند بنابراین می‌توان ادعا نمود که داده‌های موجود بیانگر اختصاصیت اتصال PC-Pep1 و PC-Pep3 به سلول هدف بوده است.

در مجموع نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن‌است که پروتکل غنی‌سازی مورد استفاده در بررسی حاضر در جداسازی پپتید اختصاصی سلول PC3 موفق بوده است. در بین پپتیدهای به‌دست آمده، پپتید PC-Pep1 و PC-Pep3 به‌دلیل فراوانی بالاتر و غنی‌سازی کارآمدتر در فرآیند غنی‌سازی می‌تواند لیگاند اختصاصی مناسبی برای اتصال به سلول‌های سرطان پروستات باشد. همچنین این پپتیدها با دارا بودن قابلیت اتصال اختصاصی به گیرنده‌های موجود در سطح سلول هدف می‌تواند به‌عنوان ترکیبی بالقوه برای انتقال ژن و دارو مورد استفاده قرار بگیرد. البته این امر نیازمند آن است که اختصاصیت پپتیدهای مزبور نسبت به سلول PC3 با شیوه‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی بیشتری بررسی شود.

بدون تردید استفاده از این پپتید برای کاربردهای بالینی نیازمند بررسی‌های بیشتر به ویژه مطالعات Exvivo روی نمونه‌های بافتی سرطان پروستات و همچنین بررسی‌های In vivo در راستای تأیید توانایی آن در اتصال به تومورهای پروستات زنوگرافت (Xenograft) انسانی ایجاد شده در مدل‌های موشی است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری ژنتیک مولکولی است. پشتیبانی مالی لازم برای انجام این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از کلیه دانشجویان گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی و گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

منابع

[1] Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. Campbell's Urology. 8th ed. Sydney: Elsevier Science Publishers, 2002.

[2] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55(1): 10-30.

[3] Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics

www.SID.ir

Archive of SID

for the detection of prostate cancer. Urology 2004; 64(2): 311-5.

[12] Landon LA, Zou J, Deutscher SL. Is phage display technology on target for developing peptide-based cancer drugs? Curr Drug Discov Technol 2004; 1(2): 113-32.

[13] Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. Prostate 2001; 47(4): 239-51.

[14] Petrenko VA, Jayanna PK. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. FEBS Lett 2014; 588(2): 341-9.

[15] Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. Nat Med. 1998; 4(6): 655-7.

[16] Poul MA, Marks JD. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. J Mol Biol 1999; 288(2): 203-11.

[17] Cwirla SE1, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(16): 6378-82.

[18] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985; 228(4705): 1315-7.

[19] Brown KC. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications. Curr Pharm Des 2010; 16(9): 1040-54.

[20] Ph.D.™-7 Phage Display Peptide Library Instruction Manual at www.neb.com/products/e8102-phd-7-phage-display-peptide-library. New England Biolabs.

[21] Newton JR, Deutscher SL, In vivo bacteriophage

of prostate cancer. Genes Dev 2000; 14(19): 2410-34.

[4] Mohagheghi MA, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer incidence in Tehran metropolis: the first report from the Tehran Population-based Cancer Registry, 1998-2001. Arch Iran Med 2009; 12(1): 15-23.

[5] Frydenberg M, Wijesinha S. Diagnosing prostate cancer - what GPs need to know. Aust Fam Physician 2007; 36(5): 345-7.

[6] Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. Urology 1997; 50(2): 239-43.

[7] Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. J Urol 1995; 154(2 Pt 1): 407-13.

[8] Carter HB. Assessing risk: does this patient have prostate cancer? J Natl Cancer Inst 2006; 98(8): 506-7.

[9] Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. N Engl J Med 2004; 350(22): 2239-46.

[10] Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. Eur Urol 2004; 46(2): 182-6.

[11] Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Mâsse B, Piché L, Chypre C. uPM3, a new molecular urine test

www.SID.ir

Archive of SID

display for the discovery of novel peptide-based tumor-targeting agents. Methods Mol Biol 2009; 504: 275-90.

[22] Newton JR1, Kelly KA, Mahmood U, Weissleder R, Deutscher SL. In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice. Neoplasia 2006; 8(9): 772-80.

[23] Arap W, Kolonin MG, Trepel M, Lahdenranta J, Cardó-Vila M, Giordano RJ, Mintz PJ, Ardelt PU, Yao VJ, Vidal CI, Chen L, Flamm A, Valtanen H, Weavind LM, Hicks ME, Pollock RE, Botz GH, Bucana CD, Koivunen E, Cahill D, Troncoso P, Baggerly KA, Pentz RD, Do KA, Logothetis CJ, Pasqualini R. Steps toward mapping the human vasculature by phage display. Nat Med 2002; 8(2): 121-7.

[24] Agris PF, Marchbank MT, Newman W, Guenther R, Ingram P, Swallow J, Mucha P, Szyk A, Rekowski P, Peletskaya E, Deutscher SL. Experimental models of protein-RNA interaction: isolation and analyses of tRNA(Phe) and U1 snRNA-binding peptides from bacteriophage display libraries. J Protein Chem 1999; 18(4): 425-35.

[25] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. Nature 1996; 380(6572): 364-6.

[26] Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. Cancer Res 1991; 51(17): 4716-20.

[27] Kevin JH, Richard GV, Hardev SP. Viral Therapy of Cancer. John Wiley & Sons, Ltd. 2008; p: 114-8.

[28] Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Association of transforming growth factor-beta with prostate cancer: An immunochemical study. Hum Pathol 1993; 24(1): 4-9.

[29] Kelly KA, Jones DA. Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection. Neoplasia 2003; 5(5): 437-44.

[30] Lee TY, Lin CT, Kuo SY, Chang DK, Wu HC. Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery. Cancer Res 2007; 67(22): 10958-65.

[31] Zhang J, Spring H, Schwab M. Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. Cancer Lett 2001; 171(2): 153-64.

[32] Lee SM, Lee EJ, Hong HY, Kwon MK, Kwon TH, Choi JY, Park RW, Kwon TG, Yoo ES, Yoon GS, Kim IS, Ruoslahti E, Lee BH. Targeting bladder tumor cells in vivo and in the urine with a peptide identified by phage display. Mol Cancer Res 2007; 5(1): 11-9.

[33] Zhang Y, Chen J, Zhang Y, Hu Z, Hu D, Pan Y, Ou S, Liu G, Yin X, Zhao J, Ren L, Wang J. Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. J Biomol Screen 2007; 12(3): 429-35.

[34] Bakhshinejad B1, Karimi M, Sadeghizadeh M. Bacteriophages and medical oncology: targeted gene therapy of cancer. Med Oncol 2014; 31(8): 110.

[35] Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. Biotechnol Adv 2010; 28(6): 849-58.

www.SID.ir