

استفاده از پروتئین های نو ترکیب به هم پیوسته در ابداع یک سیستم نو به منظور شناسایی پروتئازهای سیتوپلاسمی جدید

دکتر محمد سعید حجازی: استادیار گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: saeidhejazi@tbzmed.ac.ir

دکتر یوپ گیکن: مدرس ارشد گروه پزشکی مولکولی، انستیتو رین، کینگز کالج، دانشگاه لندن
پروفسور فرزین فرزانه: استاد پزشکی مولکولی، انستیتو رین، کینگز کالج، دانشگاه لندن

دریافت: ۸۲/۱۰/۱۰ باز نگری نهایی: ۸۳/۶/۱۴ پذیرش: ۸۳/۶/۲۱

چکیده

زمینه و اهداف: با توجه به اهمیت و نقشی که اندوپروتئازها در فیزیولوژی سلولی و ایجاد بیماری ها دارند و با عنایت به اینکه تاکنون تعداد معدودی از پروتئازهای جایگاه گزین شناخته شده اند، ابداع روش بیولوژیک تکرار پذیر و قابل اعتمادی که شناسایی اندوپروتئازهای جایگاه گزین را میسر سازد، از اهمیت بسزایی برخوردار خواهد بود. بر این اساس در تحقیق حاضر با به کارگیری پروتئین های نو ترکیب به هم پیوسته سیستم بیولوژیک جدیدی جهت شناسایی پروتئازهای سیتوپلاسمی جایگاه گزین ابداع گردید. برای ابداع سیستم مورد نظر از ترکیب عملکرد دو پروتئین نو ترکیب GAL4-VP16 و HSV.tk-Zeo استفاده شد.

روش بررسی: برای ساختن وکتورها از روش های بیولوژی مولکولی استفاده شد. وکتورهای ساخته شده توسط باکتری های پذیرا تکثیر داده شدند و جهت بررسی کارایی آنها از سلول های HeLa استفاده شد. بدین منظور سلول های حیوانی با وکتورهای ساخته شده ترانسفکت و تکثیر داده شدند. سپس با استفاده از آزمایش MTT حساسیت سلول ها به داروها مطالعه شد.

یافته ها: سلول های HeLa با وکتور pcDBHZm که حاوی کاست القا پذیر HSV.tk-Zeo بود، ترانسفکت شده و با داروی G418 انتخاب و تکثیر داده شدند. سپس سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDBHZm مجدداً با پلاسمید دیگری به نام pcG4VP16 که طی این مطالعه ساخته شده بود، ترانسفکت شدند. در این مرحله، حساسیت دو نوع سلول ترانسفکت شده نسبت به داروی GCV، در مقایسه با سلول های ترانسفکت نشده (کنترل منفی) و سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pCCI (کنترل مثبت) ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که سلول های ترانسفکت شده با pcDBHZm حدود ۳۰ برابر مقاوم تر از سلول های pcDBHZm+pcG4VP16 به GCV بودند. متعاقب اثبات این امر، پلاسمید pcG4mVP ساخته شد. در این پلاسمید محل برش چند آنزیم محدودگر ما بین قطعه نوکلئوتیدی GAL4 و VP16 ایجاد شد تا امکان قرار دادن کتابخانه نوکلئوتیدی یا توالی های مشخص را فراهم آورد که به ترتیب برای شناسایی پروتئازهای جدید و بررسی وجود پروتئازهای شناخته شده در سلول های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده مؤید کارکرد سیستم ابداع شده بود. بدین صورت که در سیستم ابداع شده، بیان کاست HSV.tk-Zeo تحت کنترل پروتئین مرکب GAL4-VP16 بوده و در حضور این پروتئین، cDNA های مزبور بیان می شوند. بیان کاست مزبور حساسیت سلول ها به GCV را در مقایسه با موقعی که VP16-GAL4 در سلول ها غیر فعال است، حدود ۳۰ برابر افزایش می دهد و باعث کشته شدن سلول های محتوی GAL4-VP16 فعال در حضور GCV می شود (انتخاب منفی). این امر امکان جدا سازی سلول های محتوی GAL4-VP16 غیر فعال (متعاقب هضم آنزیمی پروتئین مزبور) از سلول های محتوی GAL4-VP16 فعال (به دلیل عدم هضم آنزیمی پروتئین مزبور) را در حضور GCV میسر می سازد.

کلید واژه ها: اندوپروتئاز، جایگاه گزین، GAL4-VP16، HSV.tk-Zeo

مقدمه

اسید آمینه های معینی هستند که توسط پروتئازهای سلولی شناسایی و شکسته می شوند (۱). در صورت تغییر توالی اسید آمینه در زنجیره، سوبسترا توسط پروتئین شناسایی و شکسته نخواهد شد. با مکانیسم های فوق پروتئازها می توانند در فعال شدن و فرآوری پروتئین ها، گیرنده ها و آنتی ژن ها و همچنین در ایجاد بیماری ها مؤثر باشند (۲، ۳، ۴ و ۵). از این رو، پروتئازها و مهار آنها یکی از مباحث مهم در

اندوپروتئازها نقش بسیار مهمی در فیزیولوژی سلولی دارند. دسته ای از این اندوپروتئازها توالی های اسید آمینه ای خاصی را شناسایی و هضم می کنند. بر خلاف پروتئازهای موجود در لیزوزیم ها و سیستم یوبیکوئیتین، که پروتئین ها را به اجزا سازنده آنها یعنی اسیدهای آمینه می شکند و باعث تخریب و از بین رفتن پروتئین هدف می شوند، این پروتئازها جایگاه گزین^۱ هستند. جایگاه های مزبور در واقع توالی

سلول های فاقد این پروتئین، به صورت انتخابی زنده نگه داشت (با استفاده از ژئوسین) یا اینکه از بین برد (با استفاده از GCV). پروتئین مرکب GAL ϵ -VP16 از قسمت متصل شونده به DNA ی پروتئین GAL ϵ و پروتئین ترانس اکتیواتور VP16 تشکیل یافته است (۱۵ و ۱۶).

هدف عمده تحقیق حاضر به کارگیری پروتئین های نو ترکیب به هم پیوسته برای ابداع سیستم بیولوژیک جدیدی است که جهت شناسایی پروتئین های جدید و شناخته نشده سیتوپلاسمی و همچنین بررسی وجود پروتئین های شناخته شده قبلی در سلول های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد. در این سیستم دو پروتئین نو ترکیب ۱۶-VP GAL ϵ و HSV.tk-Zeo به کار گرفته شده است. HSV.tk-Zeo به عنوان ژن نشانه یا گزارشگر به کار رفته که رونویسی آن تحت کنترل پروتئین مرکب GAL ϵ -VP16 قرار داده شده است.

مواد و روش ها

پلاسمید *pCCI* پلاسمیدی با پایه رتروویروسی که دارای ۶۰۴۳ جفت باز است. این پلاسمید ژن مرکب HSV.tk-Zeo را کد می کند که به صورت همزمان، حساسیت به پیش داروی GCV و مقاومت به عامل سیتوتوکسیک ژئوسین را ایجاد می کند. در ساختمان این وکتور قبل از HSV.tk-Zeo پروموتورهای SV۴۰ و EM-۷ قرار گرفته اند. پایین دست ژن HSV.tk-Zeo، توالی چند آدنیل SV۴۰ قرار دارد (۱۷).

پلاسمید *pcDNA3.1(-)/Neo* یک پلاسمید بیان کننده (۵/۴ kb) است که دارای قسمت کلون کننده چندگانه جهت کلون کردن ژن های مختلف است. ژن کلون شده توسط پروموتور ویروس سائتومگال (CMV) رانده شده و با توالی چند آدنیل و ویروس SV۴۰ آدنیل می شود. این پلاسمید همچنین دارای یک کاست القا کننده مقاومت به نو مایسین است.

لینکرها و پرایمرها: برای ساخت وکتورهای جدید از دو لینکر مختلف ساخت کارخانه MWG-Biotech آلمان با اسامی NX(L) با توالی ۳' AATTCGCGCCGCCCCCTCTAGAC و NX (R) با توالی نوکلئوتیدی ۳' AATTGTCTAGAGGGGGCGGCCGCG استفاده شد.

آنزیم های محدود کننده و پیوند دهنده: برای بریدن DNA از آنزیم های محدود کننده مختلفی شامل آنزیم های *EcoRI*، *HindIII*، *NheI*، *XhoI* و *NotI* و به منظور پیوند دادن قطعات مختلف DNA به همدیگر، از آنزیم DNA Ligase ساخت کارخانه NEB استفاده شد.

الکتروفورز روی ژل: الکتروفورز روی ژل با غلظت تقریبی w/v ۱ درصد محتوی اتیدیوم بروماید جهت جداسازی قطعات مختلف DNA بر اساس اندازه آن ها انجام گرفت.

استخراج DNA از ژل: برای استخراج DNA از ژل، از کیت استخراج QIAEX II استفاده شد. ابتدا باند DNA از ژل بریده و پس از طی مراحل استخراج DNA ی استخراج شده در محلول Tris حل شد. رده سلولی HeLa و کشت سلولی: در این مطالعه از سلول های HeLa برای بیان انواع پروتئین ها و بررسی فعالیت آنها استفاده شد.

درمان بیماری ها از قبیل ایدز است (۶ و ۷). از پروتئین های جایگاه گزین می توان به آنزیم تبدیل کننده ایتروکین-۱ بتا با علامت اختصاری ICE اشاره کرد. این آنزیم پیشتاز ایتروکین-۱ را که یک پروتئین غیر فعال است، از محل پیوند بین اسید آمینه ۱۱۶ و ۱۱۷ هضم می کند که منجر به تولید ایتروکین-۱ بتای فعال می شود. محل شناسایی اختصاصی این آنزیم زنجیره ای پلی پپتیدی متشکل از چهار اسید آمینه است. توالی زنجیره مزبور به صورت YVAD (تیروزین، والین، آلانین و اسید آسپارتیک) است. این توالی در پیشتاز ایتروکین-۱ بتا، جایگاه های ۱۱۳ تا ۱۱۶ را تشکیل می دهد و باعث شناسایی و هضم آن توسط آنزیم ICE می شود (۸). مطالعات نشان داده اند که سلول های فاقد این آنزیم قادر به تولید ایتروکین-۱ بتا نخواهند بود، حتی اگر با استفاده از وکتورها، پیشتاز ایتروکین-۱ بتا در این سلول ها بیان شود (۹). هضم آنزیمی پروتئین ها در فعال شدن و تبدیل پیش پروتئین ها به پروتئین های فعال بسیار مهم است. با توجه به اهمیت پروتئین های اختصاصی جایگاه در پرورش پروتئین ها و فیزیولوژی سلولی، وجود یک سیستم بیولوژیک که امکان شناسایی پروتئین های جدید را فراهم سازد بسیار مهم است. HSV.tk-Zeo ژن مرکبی است که از ترکیب دو cDNA ی HSV.tk و Zeo تشکیل یافته است. قسمت HSV.tk که در انتهای ۵' این ژن مرکب قرار گرفته، آنزیم تیمیدین کیناز ویروس هرپس (HSV.TK) را کد می کند. این آنزیم پیش داروی گنسیکلوویر (GCV) را به شکل فعال تری فسفات آن (GCV-P3) تبدیل می کند که یک عامل سیتوتوکسیک است و باعث مرگ سلول ها می شود. بنابراین بیان این آنزیم در سلول ها آنها را نسبت به GCV حساس می کند. در عدم حضور HSV.TK، پیش داروی GCV به مقدار بسیار کمتر فسفات شده و برای سلول ها سمی نیست. جزء Zeo که در انتهای ۳' این ژن مرکب قرار گرفته است پروتئین Sh.ble را کد می کند که عامل مقاومت به داروی ژئوسین است و از این رو جهت اختصار با نام Zeo نیز خوانده می شود. این پروتئین ۱۳ کیلو دالتون وزن دارد (۱۱۰ و ۱۱۱) و محصول ژن Sh.ble است. این پروتئین به صورت استوکیومتری به ژئوسین می چسبد و از اتصال آن به DNA جلوگیری می کند. ژئوسین عضوی از خانواده بلئومایسین فلئومایسین است که از استرپتومایسین و ریتسپیلوس به دست می آید. این دارو خاصیت ضد باکتریایی (۱۱۰ و ۱۱۱)، ضد قارچی، ضد مخمری (۱۲)، ضد سلول گیاهی (۱۳) و سلول های حیوانی (۱۴) دارد. از این رو، این دارو برای انتخاب و جداسازی سلول ها مورد استفاده قرار می گیرد. در عدم حضور پروتئین Zeo، سلول ها به عامل ژئوسین حساس هستند و در مجاورت با آن می میرند. بیان ژئوسین باعث ایجاد مقاومت به آن در سلول ها می شود. نکته حایز اهمیت در ترکیب این پروتئین مرکب این است که قسمت HSV.TK آن باعث ایجاد حساسیت به عامل GCV ولی در عوض، جزء Zeo آن باعث بروز مقاومت به داروی ژئوسین می شود. در واقع، جزء HSV.TK امکان انتخاب منفی و جزء Zeo امکان انتخاب مثبت سلول ها را فراهم می کند. ترکیب دو انتخاب مثبت و منفی در این پروتئین مرکب این امکان را فراهم می کند که سلول های حاوی پروتئین مزبور را از سایر

روی ژل باندهای DNA ی مورد نظر از ژل بریده شد و DNA های هضم شده از ژل استخراج گردید. پس از آماده کردن قطعات DNA ی خالص با کمک آنزیم لیگاز T₄، توالی کد کننده GAL ϵ -VP₁₆ درون پلاسمید (-)pcDNA_{3.1} کلون شد. باکتری های پذیرای *E.coli* با محصول لایگیشن ترانسفورم شدند. از محصول ترانسفورماسیون چند کلونی برداشته شده و DNA ی پلاسمیدی از آنها استخراج شد. جهت بررسی وجود قطعه GAL ϵ -VP₁₆ درون پلاسمید ساخته شده، نمونه ها را با آنزیم های فوق الذکر هضم و محصول هضم شده روی ژل الکتروفورز گردید. وجود باندهای در حدود ۱۲۰۰ جفت باز انجام موفقیت آمیز مراحل بالا و وجود قطعه GAL ϵ -VP₁₆ درون محصول تهیه شده را تأیید کرد (شکل ۱).

پلاسمید ساخته شده وکتور بیان کننده یوکاریوتیک با ۶۵۶۸ جفت باز است. این وکتور بر خلاف پلاسمید اولیه pM1V₁₆ فاقد مارکر انتخابی بود و جداسازی سلول های ترانسفکت شده از سلول های ترانسفکت نشده با آن مقدور نبود، دارای کاست بیان کننده نئومایسین است که انتخاب و جداسازی سلول های ترانسفکت شده را امکان پذیر می سازد. این پلاسمید همچنین دارای اینسرت GAL ϵ -VP₁₆ است که اسیدهای آمینه ۱-۱۴۷ از ناحیه N- ترمینال پروتئین GAL ϵ را کد می کند که در واقع قسمت متصل شونده به DNA از این پروتئین است. در پایین دست توالی GAL ϵ از قطعه خارج شده توالی کد کننده اسیدهای آمینه ۴۱۳-۴۹۰ از پروتئین VP₁₆ قرار دارد که به درستی (in frame) به GAL ϵ پیوسته است که بصورت متصل به هم توانایی فعل کردن عمل ترجمه را دارند (۱۵ و ۱۶) و به صورت مستقل فاقد این توانایی هستند (۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹). ما بین توالی کد کننده آخرین اسید آمینه و جایگاه آنزیم HindIII حدود ۵۰۰ جفت باز غیر فعال وجود دارد. این امر باعث می شود تا طول قطعه جدا شده و کلون شده درون پلاسمید موجود به حدود ۱۲۰۰ جفت باز برسد. در توالی مزبور با ۲۱ جفت باز به همدیگر پیوسته اند که ۷ اسید آمینه را کد می کند. در این توالی جایگاه برش برای آنزیم های *EcoRI* و *SmaI* قرار دارد که از این دو جایگاه ها، محل برش برای آنزیم *EcoRI* منحصر به فرد است (۱۵).

ساخت پلاسمید pcG4mVP هدف از ساختن این پلاسمید تهیه وکتوری بود که امکان کلون کردن توالی های کد کننده متعدد و همچنین کتابخانه الیگونوکلوئید ما بین قطعات کد کننده GAL ϵ و VP را فراهم آورد. برای ساختن پلاسمید pcG ϵ mVP از پلاسمید ۱۶ VP pcG ϵ mVP استفاده شد. ابتدا پلاسمید مزبور با آنزیم *EcoRI* برش داده شد. آنزیم مزبور پلاسمید را از تنها جایگاه *EcoRI* که بین توالی های کد کننده GAL ϵ و VP₁₆ قرار دارد برش می دهد و آن را به شکل خطی در می آورد. پس از هضم پلاسمید، محصول به دست آمده روی ژل الکتروفورز و سپس باند مربوطه جدا و در نهایت DNA از ژل استخراج شد. از طرف دیگر، لینکر های NX(L) و NX(R) با همدیگر آنیل شدند. عمل لایگیشن ما بین محصول آنیلینگ و DNA ی استخراج شده از ژل در حضور آنزیم T₄ لیگاز انجام و ترانسفورماسیون باکتری های پذیرای *E.coli* با محصول لایگیشن

سلول های HeLa، از نوع سلول های آدنوکارسینوم و جزء سلول های چسبان هستند که در محیط DMEM محتوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FCS) کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷°C و در حضور CO₂ به مقدار ۵ درصد انکوبه شدند. سلول ها هر ۲-۳ روز تقسیم می شدند. ترانسفکت کردن سلول ها: هدف از انجام این آزمایش بیان پروتئین نو ترکیب در سلول های حیوانی با استفاده از پلاسمید است. برای ترانسفکت کردن سلول ها از روش رسوب با کلسیم فسفات استفاده شد. حدود ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن آنتی بیوتیک های مورد نظر به پلیت ها افزوده شد. بعد از حدود یک هفته، کلونی سلول های ترانسفکت شده ظاهر و سپس تکثیر داده شدند تا آزمایش های بعدی با استفاده از آنها انجام گیرد.

گنسیکلوویر GCV: گنسیکلوویر آنالوگ صنایعی گوانین (G) و مشتق آسیکلوویر است. GCV پیش دارو با خاصیت ضد ویروسی است که برای اولین مرتبه برای درمان آلودگی با ویروس هرپس سیمپلکس ساخته شد. این دارو از رپلیکاسین ویروس به صورت *in vitro* و *in vivo* از طریق جلوگیری از سنتز DNA ممانعت می کند. GCV پس از سه مرتبه فسفریله شدن تبدیل به GCV-P₃ می شود که شکل فعال GCV است. این عمل توسط یک سری آنزیم های کیناز سلولی انجام می گیرد. آنزیم HSV.TK پیش داروی GCV را به شکل یک فسفات (GCV-P₁) تبدیل می کند. قدرت این آنزیم در تبدیل GCV به GCV-P₁ هزار مرتبه بیشتر از قدرت آنزیم های کیناز سلول است (۱۸). این خاصیت HSV.TK باعث شده است تا از آن به عنوان یک عامل مهم در از بین بردن سلول ها به طریق خود کشی وابسته به GCV در پروتکل های ژن درمانی استفاده شود (۱۹). آزمایش MTT: آزمایش حساسیت دارویی به عنوان معیاری برای بررسی حضور پلاسمید در سلول ها و همچنین بررسی میزان بیان و فعالیت پروتئین نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این آزمایش بررسی مقاومت و حساسیت سلول ها نسبت به داروها متعاقب انتقال پلاسمید به آنها و مقایسه آن با سایر سلول ها بود. این آزمایش با استفاده از روش MTT انجام گرفت. این آزمایش را اولین بار موسمن (۲۰) ابداع کرد. در طی این آزمایش نمک زرد رنگ و محلول در آب تترازولیوم ۲،۵- (۲-dimethylthiazolyl-۴، ۵- (۳-diphenyltetrazolium bromide; MTT) در اثر احیا سلولی به فورمازان بنفش رنگ نا محلول در آب حل می شود (۲۰ و ۲۱). مطالعات نشان داده است که این آزمایش می تواند به عنوان معرفی برای تکثیر سلول ها در پاسخ به عوامل مختلف، از قبیل هورمون رشد و نظایر آن مورد استفاده قرار گیرد (۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵).

یافته ها

ساخت پلاسمید pcG ϵ VP₁₆ برای ساخت این پلاسمید ابتدا وکتور pM1V₁₆ با دو آنزیم *NheI* و *HindIII* بریده شد تا قطعه ۱۶- GAL ϵ VP آن خارج شود. همزمان با آن پلاسمید (-)pcDNA_{3.1} با همان آنزیم ها (*HindIII* و *NheI*) بریده شد و سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل الکتروفورز گردید. پس از انجام الکتروفورز

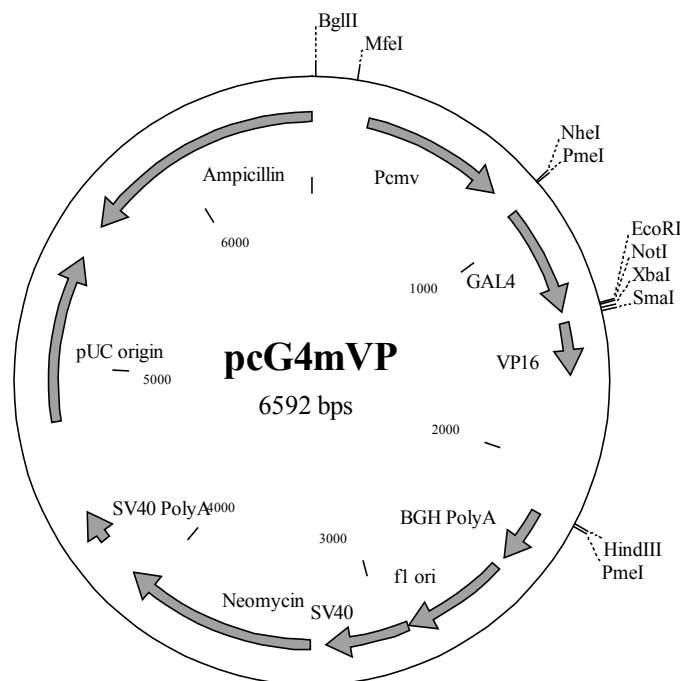
ژن مزبور بیان نشده است و به صورت خاموش می ماند، مگر اینکه پروتئین GAL ϵ -VP16 در سلول ها بیان شود.

ترانسفکت کردن سلول ها با پلاسمید pCCI به منظور تهیه سلول های شاهد مثبت، سلول های HeLa با پلاسمید pCCI که کد کننده HSV.tk-Zeo بود، به روش رسوب با فسفات کلسیم ترانسفکت شدند. سپس سلول های ترانسفکت شده در حضور ژئوسین به غلظت ۱۲۰ $\mu\text{g/ml}$ از سلول های ترانسفکت نشده جدا سازی شدند. سپس سلول های جدا شده جهت استفاده در آزمایش های بعدی تحت همان شرایط تکثیر داده شدند.

ترانسفکت کردن مجدد سلول های ترانسفکت شده با pcDBHZm با پلاسمید pcG ϵ VP16 به منظور بررسی قدرت القایی پلاسمید VP16 pcG ϵ در القاء بیان مارکر HSV.tk-Zeo، سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDBHZm مجدداً با پلاسمید pcG ϵ VP16 ترانسفکت شدند. عمل ترانسفکشن به روش رسوب با فسفات کلسیم انجام گرفت. سپس، سلول های ترانسفکت شده در حضور ژئوسین به غلظت ۱۵۰ $\mu\text{g/ml}$ از سلول های ترانسفکت نشده جدا سازی و تکثیر داده شدند. سلول های به دست آمده pcG ϵ VP16+ pcDBHZM نامیده شدند.

انجام یافت. از باکتری های ترانسفورم شده چند کلونی برداشته و کشت داده شدند و در نهایت DNA ی پلاسمیدی از باکتری ها استخراج شد. جهت بررسی موفقیت آمیز عمل اینسرشن، نمونه های پلاسمیدی با آنزیم های PmeI و XbaI هضم شدند. وجود باند های تقریبی ۴۵۰ و ۸۰۰ جفت بازی مؤید لایگیشن لینکرها درون پلاسمید بود (شکل ۲).

پلاسمید حاصل محتوی توالی های کد کننده GAL ϵ و VP16 بود که مابین توالی های کد کننده فوق دارای جایگاه های برش برای آنزیم های محدود کننده EcoRI و NotI، XbaI بود. وجود این جایگاه ها امکان کلون سازی توالی های متعدد و همچنین کتابخانه الیگو نوکلئوتیدی بین دو قطعه DNA را با جهت مشخص فراهم می آورد. ترانسفکت کردن سلول ها با پلاسمید pcDBHZm و تکثیر سلول های ترانسفکت شده: ابتدا سلول های HeLa به روش رسوب با فسفات کلسیم با پلاسمید pcDBHZm ترانسفکت شدند. سپس در حضور ۹۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از عامل سیتوتوکسیک G ϵ 18، سلول های ترانسفکت شده از سلول های ترانسفکت نشده جدا و جهت استفاده در آزمایش های بعدی تکثیر داده شدند. این پلاسمید فاقد پروموتور قوی در بالادست ژن HSV.tk-Zeo بوده و تنها دارای توالی اتصال GAL است. بنابراین در سلول های ترانسفکت شده با این پلاسمید،



شکل ۱: ساختمان پلاسمید pcG4mVP. این پلاسمید پروتئین pcG ϵ VP16 را به وسیله پروموتور ویروس سیتومگالو (CMV) کد می کند. ما بین DNA های مزبور محل های برش برای آنزیم های EcoRI، NotI، XbaI قرار داشته شده است. این جایگاه ها جهت کلون کردن کتابخانه الیگونوکلئوتید و انواع توالی های کد کننده زنجیره های اسید آمینه ایجاد شده است.

بررسی حساسیت سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با پلاسمید $pcDBHZm$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ به $G\epsilon 18$: جهت بررسی وجود پلاسمید در سلول های جدا شده، مقاومت آنها در برابر عامل سیتوتوکسیک $G\epsilon 18$ به روش MTT و در حضور $G\epsilon 18$ با غلظت های صفر، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر بررسی شد. در این آزمایش از سلول های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در غلظت صفر از $G\epsilon 18$ ۱۰۰ درصد سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با $pcDBHZm$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ زنده ماندند، در حالی که با افزایش غلظت $G\epsilon 18$ به $250 \mu g/ml$ میزان سلول های زنده مانده از سلول های ترانسفکت نشده به ۷۰ درصد و در غلظت $1000 \mu g/ml$ به حدود ۵ درصد افت کرد. این در حالی بود که میزان سلول های زنده در هر دو نوع سلول های ترانسفکت شده در هر سه غلظت فوق بیش از ۸۵ درصد بود (جدول ۱). این نتایج نشان داد که سلول های تکثیر یافته محتوی پلاسمید های ترانسفورم شده بود و نتایج حاصل به فعالیت پلاسمیدها می تواند تعمیم داده شود.

بررسی حساسیت سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با $pcDBHZm$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ به $pCCI$ جهت بررسی قدرت القا کنندگی سیستم تهیه شده، حساسیت سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید $pcDBHZm$ و سلول های ترانسفکت شده $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ به GCV آزمایش شد. در این مطالعه از سلول های ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی و از سلول های

ترانسفکت شده با پلاسمید $pCCI$ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. حساسیت سلول ها به روش MTT و با غلظت سلولی 10^4 cells/well $1 \times$ در حضور GCV با غلظت های صفر، ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر انجام گرفت. داده ها نشان دادند که در غلظت صفر از GCV ، ۱۰۰ درصد سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با $pCCI$ ، $pcDBHZm$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ زنده ماندند. با افزایش غلظت GCV به $1 \mu g/ml$ ، میزان سلول های زنده مانده از سلول های ترانسفکت شده با $pcDBHZm$ حدود ۹۶ درصد و در غلظت $1 \mu g/ml$ به مقدار ۸۸ درصد و در بالاترین غلظت GCV حدود ۹۰ درصد بود. سلول های ترانسفکت نشده نیز نتایجی مشابه سلول های $pcDBHZm$ نشان دادند. این در حالی بود که میزان سلول های زنده از سلول های $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ در عدم حضور GCV غلظت های فوق از همان دارو از ۱۰۰ درصد به ترتیب به ۶۲ درصد، ۳۲ درصد و ۳ درصد کاهش یافت. حساسیت سلول های آلوده شده با پلاسمید $pCCI$ تقریباً مشابه سلول های اخیر بود که به ترتیب مقدار سلول های زنده آنها در عدم حضور GCV و غلظت های افزایش یابنده آن به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۲ درصد، ۳۴ درصد و ۲۱ درصد بود. داده ها نشان می دهند که درصد سلول های زنده $pcDBHZm$ در غلظت $10 \mu g/ml$ از GCV حدود ۳۰ برابر بیشتر از مقدار سلول های زنده از نوع $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ در همان غلظت از دارو است (جدول ۲).

جدول ۱: میزان سلول های زنده مانده از سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با $pcDBHZm$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ در غلظت های متغیر $G\epsilon 18$.

غلظت $G\epsilon 18$ ($\mu g/ml$)			نوع سلول (HeLa)
$1000 \mu g/ml$	$250 \mu g/ml$	$0 \mu g/ml$	
٪۷۰	٪۷۰	٪۱۰۰	ترانسفکت نشده
٪۸۹	٪۹۶	٪۱۰۰	ترانسفکت شده با $pcDBHZm$
٪۹۷	٪۱۰۰	٪۱۰۰	ترانسفکت شده با $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$

جدول ۲: میزان سلول های زنده مانده از سلول های ترانسفکت نشده، ترانسفکت شده با $pcDBHZm$ ، $pCCI$ و $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$ در غلظت های متغیر GCV .

غلظت GCV ($\mu g/ml$)				نوع سلول (HeLa)
$10 \mu g/ml$	$1 \mu g/ml$	$0.1 \mu g/ml$	$0 \mu g/ml$	
٪۸۰	٪۸۱	٪۸۷	٪۱۰۰	ترانسفکت نشده
٪۲۱	٪۳۴	٪۹۲	٪۱۰۰	ترانسفکت شده با $pCCI$
٪۹۰	٪۸۸	٪۹۶	٪۱۰۰	ترانسفکت شده با $pcDBHZm$
٪۳۲	٪۳۲	٪۶۲	٪۱۰۰	ترانسفکت شده با $pcDBHZm+pcG\epsilon VP16$

نتایج حاکی از آن بود که سلول های ترانسفکت شده با pcDBH2m حساسیتی مشابه سلول های ترانسفکت نشده داشتند و نسبت به GCV مقاوم بودند که دلیل بر عدم بیان کاست HSV.tk-Zeo در این سلول ها است. در حالی که سلول های pcG ϵ VP16+pcDBH2m حساسیتی شبیه سلول های pCCI نشان دادند که بیانگر این است که سلول های pcDBH2m+pcG ϵ VP16 همانند سلول های کنترل مثبت pCCI که به GCV حساسیت نشان دادند، به GCV حساس هستند. به عبارتی دیگر، کاست HSV.tk-Zeo در این سلول ها به دلیل حضور VP16-GAL ϵ بیان می شود.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به اهمیتی که پروتئازهای جایگاه گزین (۱) در فیزیولوژی سلولی و بیماری ها (۲، ۳، ۵) دارند وجود سیستمی قابل اعتماد، آسان و قابل تکرار که امکان شناسایی پروتئازهای جدید را ممکن سازد بسیار مهم است. هدف از مطالعه حاضر ابداع سیستمی برای شناسایی پروتئازهای جدید جایگاه گزین و احیاناً پروتئازهای اختصاصی بافت و همچنین بررسی وجود پروتئازهای شناخته شده در بافت های مختلف است.

سیستم ابداع شده مجموعه ای از دو پروتئین نو ترکیب VP16-GAL ϵ و HSV.tk-Zeo است. در این ترکیب از HSV.tk-Zeo به عنوان ژن گزارشگر استفاده شده که رونویسی آن تحت کنترل VP16-GAL قرار داده شده است. HSV.tk-Zeo ژن مرکبی است که قسمت HSV.tk آن آنزیم تیمیدین کیناز ویروس هرپس (HSV.TK) را کد می کند که پیش داروی گنسیکلو ویر (GCV) را به شکل فعال تری فسفات آن (GCV-P3) تبدیل می کند که عامل سیتوتوکسیک است و باعث مرگ سلول ها می شود (۱۸). در عدم حضور HSV.YK پیش داروی GCV به مقدار بسیار کم فسفات شده و برای سلول ها سمی نیست. بنابراین بیان این آنزیم در سلول ها آنها را نسبت به GCV حساس می کند. جزء Zeo که در انتهای ۳' این ژن مرکب قرار گرفته است، پروتئین zeo (Sh.ble) را کد می کند که عامل مقاومت به داروی زئوسین است (۱۰، ۱۱ و ۱۴). بنابراین، قسمت HSV.TK-Zeo باعث ایجاد حساسیت به عامل GCV و مقاومت به زئوسین می گردد. در واقع، جزء HSV.TK امکان کشتن سلول ها (انتخاب منفی) و جزء Zeo امکان زنده نگهداشتن (انتخاب مثبت) سلول ها را فراهم می کند تا با کمک گیری از آن، سلول های حاوی پروتئین مزبور را از سایر سلول های فاقد این پروتئین، به صورت انتخابی زنده نگه داشت (با استفاده از زئوسین) (۱۰ و ۱۱) یا اینکه از بین برد (با استفاده از GCV) (۱۹).

پروتئین مرکب VP16-GAL ϵ از قسمت متصل شونده به DNA ی پروتئین GAL ϵ و ترانس اکتواتور VP16 تشکیل یافته است (۱۵ و ۱۶). اجزا این پروتئین به تهابی فاقد قدرت فعال سازی رونویسی هستند ولی موقعی که به هم دیگر متصل می شوند توانایی بیان ژن را دارند (۲۶، ۲۷، ۲۸ و ۲۹).

در این مطالعه ابتدا سلول ها با وکتور pcDBH2m ترانسفکت شدند. پلاسمید مزبور محتوی کاست HSV.tk-Zeo است که در آن

توالی DNA ϵ که GAL ϵ به آن متصل می شود، پنج بار تکرار شده و به دنبال آن به ترتیب جعبه TATA و cDNA های کد کننده HSV.tk و Zeo (Zeo-HSV.tk) قرار گرفته است. سلول های HeLa با وکتور pcDBH2m ترانسفکت شده و با داروی GAL ϵ انتخاب و سپس تکثیر داده شدند. سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDBH2m مجدداً با پلاسمید دیگری به نام pcG ϵ VP16 که طی این مطالعه ساخته شده بود ترانسفکت شدند. جهت بررسی وجود پلاسمید در سلول های جدا شده مقاومت آنها در برابر عامل سیتوتوکسیک GAL ϵ به روش MTT بررسی شد (۲۰ و ۲۱). نتایج به دست آمده نشان دادند که سلول های تکثیر یافته محتوی پلاسمید های ترانسفورم شده هستند و حساسیت یا مقاومت سلول های تهیه شده به GCV ناشی از فعالیت پلاسمیدها خواهد بود. سپس حساسیت سلول های ترانسفکت شده با دو پلاسمید pcDBH2m+pcG ϵ VP16 نسبت به GCV مقایسه با سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pcDBH2m بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که حساسیت سلول های ترانسفکت شده به GCV همانند حساسیت سلول های ترانسفکت شده با pcDBH2m است. هر دو این سلول ها نسبت به GCV مقاوم بودند و بیش از ۸۰ درصد سلول ها در غلظت ۱۰ μ g/ml از این دارو زنده ماندند. در حالی که سلول های pcDBH2m+pcG ϵ VP16 حساسیتی شبیه سلولهای pCCI (کنترل مثبت) (۱۷) داشتند. بدین معنی که سلول های pcDBH2m+pcG ϵ VP16 همانند سلول های کنترل مثبت ترانسفکت شده با pCCI نسبت به GCV حساس بودند. در صد رشد و زنده بودن این سلول ها با افزایش غلظت GCV به شدت کاهش یافت، به طوری که در غلظت ۱۰ μ g/ml از GCV حدود ۳ درصد از سلول های ترانسفکت شده با دو پلاسمید زنده ماندند.

تشابه رفتاری و مقاومت سلول های pcDBH2m و سلول های ترانسفکت نشده بیانگر عدم بیان کاست HSV.tk-Zeo در این سلول ها است. به عبارتی دیگر، کاست HSV.tk-Zeo در این سلول ها به دلیل عدم حضور VP16-GAL ϵ بیان نمی شود. از طرف دیگر، حساسیت زیاد سلول های pcDBH2m+pcG ϵ VP16 دلیل بر بیان کاست HSV.tk-Zeo به علت بیان پروتئین VP16-GAL ϵ در این سلول ها بود. نتایج فوق نشان دادند که بیان کاست HSV.tk-Zeo کاملاً تحت کنترل پروتئین مرکب VP16-GAL ϵ است و در حضور این پروتئین cDNA های مزبور بیان می شوند. در صد سلول های زنده pcDBH2m در غلظت ۱۰ μ g/ml از GCV حدود ۳۰ برابر بیشتر از مقدار سلول های زنده از نوع pcDBH2m+pcG ϵ VP16 در همان غلظت از دارو بود. یعنی حساسیت سلول ها به GCV در حضور و عدم حضور VP16-GAL ϵ حدود ۳۰ برابر تغییر می کند. بنابراین سیستم ابداع شده امکان جداسازی سلول ها با استفاده از داروی GCV را در حالت فعالیت و عدم فعالیت VP16-GAL ϵ میسر می سازد.

به دنبال اثبات صحت پلاسمیدهای ساخته شده و کارکرد آنها پلاسمید دیگری به نام pcG ϵ mVP ساخته شد. در این پلاسمید محل برش آنزیم های NotI، EcoRI و XbaI ما بین GAL ϵ و VP16 افزوده

آنزیم های سیتوپلاسمی قرار می گیرد و GAL ϵ از VP16 جدا می شود. جدا شدن پروتئین منجر به غیر فعال شدن آن و در نتیجه عدم بیان HSV.tk-Zeo و مقاومت به GCV می شود. بالطبع سلول های مزبور به دلیل مقاومت به GCV، در حضور این دارو به رشد خود ادامه خواهند داد، در حالی که سلول های نوع اول از بین خواهند رفت. این فعل و انفعالات با بروز کلونی در ظرف کشت ظاهر می شود. جهت شناسایی توالی اسید آمینه هایی که توسط پروتئین ها شکسته می شوند، سلول های مزبور تکثیر داده شده و با استفاده از RT-PCR توالی مزبور مشخص می شود. با کلون کردن توالی های شناخته شده و مشخص درون پلاسمیدهای این سیستم، از آن برای بررسی وجود پروتئین های شناخته شده در بافت های مختلف نیز می توان استفاده کرد.

شد تا امکان کلون کردن توالی های مختلف در جهت مشخص را فراهم آورد.

جهت شناسایی پروتئین های جدید کتابخانه نوکلئوتیدی با استفاده از محل های کلونینگ ایجاد شده بین توالی های کد کننده GAL ϵ و VP16 در پلاسمید pcG ϵ VP16 یا pcDBHZGmV قرار داده می شود. سپس سلول ها در حضور GCV انتخاب می شوند. بدیهی است در سلول هایی که پروتئین VP16-GAL ϵ فاقد سوسترا برای اندوپروتئین های سیتوپلاسمی است، به دلیل عدم هضم آنزیمی، پروتئین مزبور به صورت متصل به هم فعال باقی می ماند و باعث بیان HSV.tk-Zeo و نهایتاً بروز حساسیت در سلول ها می شود. سلول های مزبور به دلیل حساسیت به GCV، در حضور این دارو از بین می روند. در حالی که سلول هایی که پروتئین VP16-GAL ϵ بیان شده در آنها محتوی سوسترای مناسب برای پروتئین های سیتوپلاسمی است، تحت تأثیر

References

- Dunn B. A taste test for proteases. *Nat. Biotech.* 2000; 18 (Feb): 149-150.
- Yewdwl 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.
- Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. *Physiol Rev.* 2004; 84(2): 579-621.
- 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.
- Bahou WF. Protease-activated Receptors. *Curr Topics in Devel Biol.* 2003; 54:343-69.
- Vierling P, Greiner J. Prodrugs of HIV Protease Inhibitors. *Curr Pharmaceutical Design.* 2003; 9(22):1755-70.
- 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.
- 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-1 β processing in monocytes. *Nature.* 1992; 356(6372): 768-774.
- Young P R, Hazuda D J, Simon P L. *J. Cell Biol.* 1988; 107 (August): 447-456.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- Sadowski I, Brendan B, Peter Broad, Melvyn Hollis. GAL4 Fusion Vectors for expression in Yeast or Mammalian Cells. *Gene.* 1992; 118: 137-141.
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an Unusually Potent Transcriptional Activator. *Nature.* 1988; 335: 563-564.
- 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.

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.