

بررسی اثرات آپوپتوزیس القاء شده پروتئین ژن VP₂ کلون شده از ژنوم ویروس بورس عفونی بر سلولهای سرطانی لنفوسیتی B انسان در *in vitro*

مهرداد هاشمی^۱، سید علی قرشی^۲، کاظم پریور^۳، عبدالخالق دیزجی^۴،

مهدی شمس آرا^۵، یوسف دوستار^۵، معصومه بخشایش^۶

^۱ دانشجوی دکترای ژنتیک ملکولی، گروه ژنتیک ملکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
^۲ استاد، پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن آوری زیستی
^۳ استاد، گروه زیست جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
^۴ استادیار، گروه ژنتیک ملکولی، پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن آوری زیستی
^۵ استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
^۶ کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: آپوپتوزیس یا مرگ سازمان یافته، اصلی ترین مکانیسم در تکامل و هموستاز بافت های بالغ در جهت حذف سلول های غیر ضروری است که القای آن روشی موثر در درمان سرطان می باشد. هدف این مطالعه بررسی القای آپوپتوزیس پروتئین VP₂ کلون شده از ژنوم بورس عفونی بر سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان می باشد.

روش بررسی: در این تحقیق پس از کلونینگ ژن VP₂ در داخل مخمر پیکیا پاستوریس، پروتئین بیان گردید. توان حیاتی سلول ها با روش MTT ارزیابی شد. سپس اثر پروتئین VP₂ بر سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان با رنگ آمیزی Hoechst و فلوسایتمتری مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: در روش MTT سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان در غلظت های ۱ و ۵ میکروگرم، مرگ سلولی معنی داری را نسبت به گروه های شاهد نشان دادند ($p < 0/01$). با رنگ آمیزی Hoechst اجسام آپوپتوتیک مشخص گردید و با ارزیابی فلوسایتمتری، ۴۸ ساعت زمان مناسبی برای القای آپوپتوز بود.

نتیجه گیری: در این بررسی برای اولین بار مشخص گردید، پروتئین حاصل از کلونینگ ژن VP₂ از ویروس IBDV قادر است به تنهایی در محیط خارج از بدن بر سلول های سرطانی لنفوسیت B آپوپتوزیس را القا نماید.

واژگان کلیدی: کلونینگ، آپوپتوزیس، ژن VP₂، سلول های سرطانی لنفوسیتی B انسان

مقدمه

IBDV) bursal disease virus (ایجاد می گردد. ویروس با تأثیر بر سلول های لنفوسیتی B نابالغ در بورس فابریسیوس و سایر اندام های لنفوئیدی باعث تخریب سلولی بافت بورس و طحال می گردد. در مواردی از تخریب بافتی، پاسخ های آماسی وجود نداشته و به نظر می رسد که در این موارد مکانیسم اساسی تخریب بافتی از طریق آپوپتوزیس باشد (۲،۱). رخداد آپوپتوزیس در سلول های آلوده به ویروس می تواند در بقاء ویروس و انتشار آن حائز اهمیت باشد، زیرا که در سلول های

بیماری گامبورو (Gumboro disease) نوعی بیماری حاد و واگیردار ویروسی پرندگان است که توسط ویروس از خانواده بیرناویروس به نام ویروس بیماری بورس عفونی Infectious

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، مهرداد هاشمی
(email: Hashemi_mehrdad@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۳/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۵

آلوده به ویروس سیگنال‌های آپوپتوزیس زمانی آغاز می‌شود که ویروس در انتهای مراحل رپلیکاسیون خود بوده و به دنبال آپوپتوزیس سلول آلوده ذرات ویروسی منتشر و سایر سلول‌ها را آلوده می‌نماید (۳).

ویروس بورس عفونی دارای ژنوم ریبونوکلیئیک اسید دوبخشی و قطعه قطعه می‌باشد. بر روی بخش بزرگ‌تر ریبونوکلیئیک اسید، ۳ پروتئین کد شده است. قسمت عمده پروتئین‌های ساختمان ویروس را پروتئین‌های ۲ و ۳ (VP2, VP3) تشکیل می‌دهند و پروتئین چهارم (VP4) غیرساختاری است و پیش‌ساز پلی پروتئین‌های ویروس است. پروتئین ۱ ویروس (VP1) بر روی بخش کوچک ریبونوکلیئیک اسید کد شده است و وظیفه آن تکثیر ویروس است (۴). مشخص شده است پروتئین‌های VP2 و VP5 از طریق آپوپتوز سلول در آزاد شدن ویروس نقش دارند (۷-۵).

مطالعات خارج از بدن (in vitro) پروتئین‌های ویروس عامل بیماری بورس عفونی توسط Fernandez در سال‌های اخیر بیانگر این است که بیان پروتئین VP2 درون رده سلولی اپیتلیال BSC40 اثرات القائی آپوپتوزیس می‌باشد. پروتئین VP2 احتمالاً از طریق مهار ژن BCL-2 اثرات القائی خود را ایفا می‌کند (۸). در بررسی اخیر مشخص گردید همواره مابین شدت ویروس و شدت تغییرات آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس ارتباط معنی‌داری وجود دارد. در تفسیر شدت تغییرات آپوپتوزیس می‌توان گفت که حضور کافی پروتئین‌های ویروسی و سیتوکین‌ها می‌تواند در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B موثر واقع گردد (۹).

آپوپتوزیس یا مرگ سازمان یافته، اصلی‌ترین مکانیسم در تکامل و هموستاز بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های غیرضروری، آلوده، موتاسیون یافته و یا آسیب دیده بواسطه مسیرهای خودکشی داخلی است. آسیب در برابر اشعه‌های یونیزان، عفونت‌های ویروسی و سیگنال‌های خارجی عواملی از سیگنال‌های توانا در به‌راه انداختن آپوپتوزیس هستند. مسیرهای انتقال سیگنال‌ها که باعث آغاز فعال شدن آبخاری آنزیم‌هایی بنام کاسپاز می‌گردند، آسیب‌های سلولی که باعث افزایش نفوذپذیری غشا میتوکندری‌ها و فعال شدن آنزیم‌های کاسپازی می‌شوند، آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 و تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق می‌گردد و مسیر آسیب‌های غشا سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و در نهایت تولید عامل سرآمدی از ترکیبات لیپیدی غشا سلول میشود، چهار سیستم اصلی در راه‌اندازی آپوپتوزیس می‌باشند (۱۳-۱۰).

ویروس‌های خیلی حاد به‌طور انتخابی لنفوسیت‌های B را آلوده می‌کنند. اگر این ویروس‌ها بصورت مصنوعی وارد سلول‌های لنفوبیدی غیر B شوند، به همانندسازی خود ادامه می‌دهند. بنابراین آلوده نشدن سلول‌های لنفوبیدی غیر B توسط ویروس‌های خیلی حاد باید ناشی از ناتوانی در تشخیص یک گیرنده باشد. بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که ویروس‌های خیلی حاد گیرنده خاصی را روی سلول‌های لنفوبیدی B تشخیص می‌دهد (۱۴). بر پایه نتایج فلوسیتومتری، طیف میزبانی ویروس به‌وسیله یک گیرنده N-گلیکوپروتئینی، که روی لنفوسیت‌های B پوشیده شده با IgM است، تعیین می‌شود (۱۵، ۱۶). ویروس با پروتئین‌های غشاء سلول بر هم کنش می‌دهند. با توجه به ساختار ژنومی عامل بورس عفونی، ژن مولد VP2 زمانی که در داخل سلول بیان می‌گردد در القاء آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B نابالغ نقش اساسی داشته و برای ایجاد آپوپتوزیس در سلول‌های یاد شده از طریق افزایش بیان ژن‌های Bax و مهار ژن Bcl2 باعث ایجاد آپوپتوزیس می‌گردد (۸). پروتئین VP2 ایمونوژن اصلی ویروس است و اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده ویروس روی آن قرار دارند. بخش میانی ژن VP2 (نوکلئوتیدهای ۷۶۲ تا ۱۱۵۱) متغیر است و باعث اختلافات آنتی‌ژنی، خواص پاتوژنی و گرایش سلولی در سویه‌های مختلف ویروس می‌شود (۱۷، ۱۸). سایتوکاین‌های آزاد شده از سلول‌های T و ماکروفاژها خودشان نقش القائی در آپوپتوزیس دارند، به‌طوری که با هدف قرار دادن نفوذپذیری میتوکندری‌ها سبب تخلیه پروتئین‌های میتوکندریایی به سیتوزول سلول شده که از آن جمله می‌توان سیتوکروم C را نام برد. سیتوکروم C نیز در حضور ATP با Apf-1 ترکیبی را ایجاد می‌نماید که قادر است پروکاسپاز-۹ را فعال نماید. بنابراین پلی را مابین محرک‌های مختلف آپوپتوزیس و آغاز آبخاز کاسپازی برقرار می‌کند (۱۹، ۲۰). معمولاً به دنبال اثر سیتوکین‌ها و آنتی‌ژن‌های ویروسی عامل بسیار مهمی به نام NF-kB به عنوان کوفاکتور فعال کننده رونوشت‌برداری برخی از ژن‌های مولد آپوپتوزیس در لنفوسیت‌های B نقش ایفا می‌کند. نقش این پروتئین‌ها در بیماری‌های ویروسی ثابت شده است. از سیتوکین‌های آزاد شده دیگر، TNF- α است که با اتصال به گیرنده‌های ویژه خود به نام TNF-R₁ و TNF-R₂ باعث تریمریزاسیون در گیرنده‌های فوق شده و جایگاهی به نام جایگاه مرگ یا TRADD (TNFR-Associated Death Domain) ایجاد می‌گردد. این جایگاه توانایی به‌کارگیری TRAFs (TNFR-Associated Factors) را در جهت فعال سازی NF-kB و مسیر JNK/AP₁

VP2-F (نوکلئوتید ۱۳۹-۱۲۲):

5'-CGGAATTCATCGCAGCGATGACAAAC-3'
EcoRI

محل برش آنزیم EcoRI روی پرایمر نمایش داده شده است.

VP2-R (نوکلئوتید ۱۴۸۶-۱۴۶۷):

5'-TACTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTG
CCTTATGGCCCGATTATGT-3'

پرایمر VP2R در بخش ۵' حاوی محل برش آنزیم XhoI، کدون خاتمه ترجمه و توالی کدکننده برچسب هیستیدینی (6XHis) بود. CTCTGAG محل برش آنزیم XhoI، TTA کدون خاتمه ترجمه و ATGGTGATGGTGATGGTG برچسب هیستیدینی (6XHis) بود.

۲- پرایمرهای جفت دو شامل (Forward) 5'-AOX1 و (Reverse) 3'-AOX1 که برای بررسی کلونهای ترانسفورم شده پ. پاستوریس استفاده شدند. ژن الکل اکسیداز ۱ (AOX1) مولد آنزیمی است که آنزیم ۸۵٪ مصرف متانل را توسط آنزیمهای الکل اکسیداز در پ. پاستوریس برعهده دارد. توالی این پرایمرها بدین شرح است:

5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' 5'-AOX1

5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' 3'-AOX1

در واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) دمای اتصال برای پرایمرهای AOX1 ۵۵ درجه سانتی‌گراد و برای جفت پرایمر دیگر ۶۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. زمان ساخت رشته‌ها برای دو جفت پرایمر ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد.

از پلاسمید pPICZA (Invitrogen) جهت بیان پروتئین VP2 در مخمر استفاده شد. این وکتور دارای طولی به اندازه ۳۳۲۹ جفت باز بوده و برای بیان داخل سلولی مناسب می‌باشد. پلاسمید pPICZA با آنزیمهای EcoRI و XhoI هضم شد و پس از تخلیص محصول، هضم آنزیمی به‌وسیله High Pure PCR Purification Kit (Roche) از روی ژل آگارز، واکنش لیگاسیون pPICZA با قطعه VP2 به‌مدت یک شب در ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام و محصول لیگاسیون تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. محصول لیگاسیون منجر به تولید پلاسمیدهای نوترکیب VP2/pPICZA شد که به سلول‌های مستعد شده E.coli سویه TOP10F' ترانسفورم شد. انتخاب کلونی‌های نوترکیب روی پلیت‌های LB با نمک پایین و در حضور ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ژئوسین صورت گرفت. چندین کلونی مقاوم به ژئوسین برداشته شده، سپس استخراج پلاسمید

داراست. از طرف دیگر TRADD با FADD کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که قادر است کاسپاز ۸ را به خدمت درآورد و به همراه آن گیرنده TNF-R₁ قادر است آپوپتوزیس را از طریق مولکول سازگار RAIDD (RAIDD Associated Ich-1/CED) و واکنش با جایگاه جایگاه مرگ RIP و واسطه CARD باعث فعال شدن کاسپاز ۲ و در نهایت آپوپتوزیس می‌گردد (۲۱، ۲۲). بر این اساس، بر آن شدید پس از کلونینگ و استخراج پروتئین VP2 نقش آن را در القای آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی B انسان بررسی کنیم تا شاید در آینده بتوان از آن در درمان بیماری‌ها استفاده کرد.

مواد و روشها

در این مطالعه مداخله‌ای پس از کلونینگ ژن VP2 داخل مخمر پیکیاپاستوریس، پروتئین بیان شد و اثر غلظت‌های مختلف آن بر سلول‌های لنفوسیتی B مورد بررسی قرار گرفت. برای کلونینگ ژن و استخراج پروتئین VP2 ویروس در مخمر پیکیاپاستوریس *Pichia pastoris*، از سیستم راه-اندازی شده در بخش ژنتیک ویروس پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی استفاده گردید. ابتدا RNA کل سلول به‌روش کیت RNAfast (تهیه شده در پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی) که بر اساس استفاده از گوانیدینوم ایزوسیانات است، از نمونه‌های آلوده بافت بورس استخراج گردید و پس از بررسی نتیجه استخراج روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز، RNA تا زمان استفاده در °C ۷۰- نگهداری شد. برای واکنش رونویسی معکوس Reverse transcription (RT) به منظور ساخت cDNA، از (Roche Expand First Strand cDNA Synthesis Kit Molecular Biochemicals, Germany) استفاده شد. در این کیت با جهش‌زایی در انتهای کربوکسیل آنزیم نسخه‌بردار معکوس (M-MuLV) molony murin leukemia virus خاصیت RNaseH آن از بین رفته است. جهت طراحی پرایمرها، توالی ژن VP2 ویروس بیماری بورس عفونی از GenBank گرفته شد و دوجفت پرایمر طراحی شد.

۱- پرایمرهای جفت یک بنام VP2-F (Forward) و VP2-R (Reverse) که برای تکثیر و کلون کردن طول کامل ژن VP2 به کار رفتند. این پرایمرها بر اساس توالی قطعه A ویروس بورس عفونی سویه CEF94 (AF194428) طراحی شدند. پرایمرها در انتهای ۵' حاوی محل برش آنزیم محدود الاثر بودند. جایگاه آنزیم‌های انتخاب شده روی توالی ژن VP2 وجود نداشتند. توالی این پرایمرها به شرح زیر است:

روی یخ قرار گرفتند. به هر میلی لیتر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز سلول اضافه و مخلوط شد. هم‌حجم محتوی لوله، بید شیشه‌ای اضافه شد. هشت بار متوالی ۱ دقیقه ورتکس و ۱ دقیقه انکوباسیون روی یخ انجام شد. سانتریفوژ در rpm ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محلول رویی به میکروتیوب جدید منتقل گردید. از آنجایی که هدف نهایی بررسی تاثیر پروتئین نوترکیب VP2 بر سلول‌های سرطانی بود، پروتئین‌ها در حالت طبیعی و غیردنا توره تخلیص شدند. تخلیص پروتئین نوترکیب VP2 حاوی برچسب 6XHis با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از رزین Ni-NTA در یک سرنگ انسولین ریخته شد که از قسمت زیرین بوسیله پنبه یا پشم شیشه مسدود شده بود. رزین با ۵ حجم بافر اتصال شسته شد. عصاره سلولی با سرعت جریان حدود ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. فاز خارج شده از ستون در یک لوله نگهداری شد. ستون با ۵ حجم بافر شستشو حاوی ۲۰ mM ایمیدازول شسته شد و محلول خارج شده جمع گردید. مجدداً ستون با ۵ حجم بافر شستشو حاوی ۳۰ mM ایمیدازول شسته شد و مایع خارج شده در لوله‌ای جمع‌آوری شد. سپس شستشوی ستون با ۵ حجم بافر حاوی ۴۰ mM ایمیدازول ادامه یافت و بخش خارج شده جمع‌آوری شد. در آخر ستون پروتئین با ۵ حجم بافر خارج‌کننده حاوی ۲۵۰ mM ایمیدازول شسته شد و بخش خارج‌شده نگهداری گردید. فازهای جمع‌آوری شده در SDS-PAGE بررسی شدند (شکل ۳). از آنجایی که ایمیدازول باعث رسوب پروتئین هنگام یخ زدن می‌شود، مابقی پروتئین تخلیص شده پس از دیالیز در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شرایط تخلیص پروتئین با افزایش غلظت NaCl و افزودن توین ۲۰ بهینه شد. اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد (۲۳).

چهار رده سلول سرطانی لنفوسیت B انسان شامل Ramos (Burkitt's Lymphoma) Raji، (Burkitt's Lymphoma)، 183-E95 (Human chronic Lymphocytic Leukemia) و Nalm6 (Pre B cell Leukemia) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI1610 (Sigma) به‌علاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) FBS، ۲ میلی مولار L- گلوتامین، ۲۵ میلی مولار HEPES، ۲/۲۴۰ گرم‌در-لیتر بی‌کربنات سدیم، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استروپتوماسین در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰٪، CO₂ ۵٪ رشد کردند. در شروع کشت در هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی، ۵ × ۱۰^۵ سلول ریخته شد و زمانی که رشد

به‌وسیله High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) انجام شد. (شکل ۱)

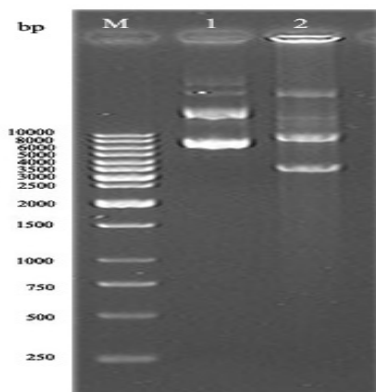
برای ترانسفورم کردن سلول‌های پیکیا پاستوریس ابتدا پلاسمید pPICZA/VP2 بوسیله آنزیم SacI خطی و پس از آماده شدن سلول‌های پیکیا پاستوریس برای ترانسفورماسیون، به‌علت بازده بالا ترانسفورماسیون به‌روش الکتروپوریشن انجام شد. سوبه مورد استفاده پیکیا پاستوریس، سوبه X-33 بود که همانند تیپ وحشی Mut⁺ قادر است در محیط حاوی متانول رشد کند. الکتروپوریشن در شرایط ۱/۵ kV، ۲۵ μF و ۲۰۰ Ω به مدت ۷-۸ میلی‌ثانیه اعمال شد و بلافاصله ۱ میلی‌لیتر سوربیتول ۱M سرد اضافه گردید. محتویات کووت به یک فالکن ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و ۱-۲ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد (بدون شیک شدن) انکوبه و محصول الکتروپوریشن روی پلیتهای YPDS حاوی ۱٪ عصاره مخمر، ۲٪ پپتون و ۲٪ گلوکز به‌همراه ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ژنوسین در ۳۰- ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ روز کشت شد تا کلونی‌ها تشکیل گردند. جهت تعیین چگونگی مصرف متانول توسط ترانسفورمتهای پ. پاستوریس، فنوتیپ‌های Mut⁺ و Mut^S بوسیله رشد در پلیتهای MD (Minimal Dextrose Medium) و MM (Minimal Methanol Medium) تعیین شدند و ترانسفورمتهای پ. پاستوریس با فنوتیپ Mut⁺ انتخاب گردیدند. جهت تایید ادغام ژن VP2 به‌درون ژنوم ترانسفورمت پیکیا پاستوریس، DNA کروموزومی مخمر به‌روش DNAfast (تهیه شده در پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و فن‌آوری زیستی) استخراج و با استفاده از پرایمرهای AOX1، و اکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) انجام شد و پس از الکتروفورز، نتایج آنالیز گردید (شکل ۲).

کلون انتخاب شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BMGY (حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۲۰ گرم پپتون در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۱M (pH ۶)، ۱۰۰ میلی‌لیتر 10X YNB، ۲ میلی‌لیتر بیوتین ۵۰۰X و ۱۰۰ میلی‌لیتر گلیسرول ۱۰X) تا رسیدن OD₆₀₀ به ۶-۲ کشت شد. سلول‌ها با سانتریفوژ در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. پس از خارج کردن محلول رویی، پلت سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BMMY (در مورد محیط BMMY به‌جای گلیسرول، ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۱۰X اضافه شد) سوسپانسیون شد. جهت القاء بیان پروتئین، هر ۲۴ ساعت، متانول در غلظت نهایی ۱٪ اضافه شد. القاء بمدت ۱۴۴ ساعت ادامه یافت. سلول‌ها با سانتریفوژ در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند. محلول رویی خارج و پلت سلولی

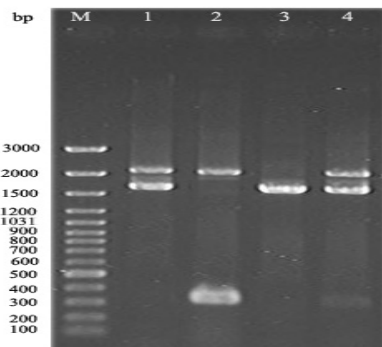
۴۸ ساعت، با عمل سانتریفوژ (سرعت ۲۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و یک بار با محلول PBS شستشو و عمل سانتریفوژ تکرار گردید. از کیت Annexin-V-fluos stainig (Roche) جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده گردید. پس از عمل سانتریفوژ، با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول Annexin-V-fluos Labeling شامل (Annexin-V-fluorecein, Propidium iodide) به سلول‌ها انکوباسیون در دمای ۱۵ الی ۲۵ درجه به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه انجام و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتر آنالیز شدند (۲۴).

یافته‌ها

در شکل ۱ پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج شده از کلونی‌های مقاوم به زئوسین و در شکل ۲ PCR از روی DNA ژنومی مخمر پس از اینتگریت شدن پلاسمید داخل ژنوم مخمر نشان داده شده است.



شکل ۱- استخراج پلاسمید از کلونی‌های مقاوم به زئوسین. ردیف M نشانگر وزن مولکولی DNA، ردیف ۱ پلاسمید pPICZA/VP2؛ ردیف ۲ پلاسمید pPICZA



شکل ۲- PCR از روی DNA ژنومی مخمر با استفاده از پرایمرهای AOX1 (ردیف M نشانگر وزن مولکولی DNA، ردیف‌های ۱ و ۲ پلاسمید pPICZA/VP2 با فنوتیپ Mut⁺؛ ردیف ۳ pPICZA/VP2 با فنوتیپ Mut^s)

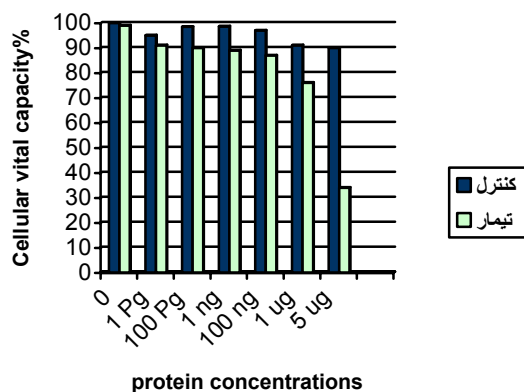
سلول‌ها به مرحله لگاریتمی رسید پس از ارزیابی سیتوتوکسیسیته و سنجش توان حیاتی، سلول‌ها با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین نو ترکیب VP2 تیمار شدند. همچنین پس از کلیه مراحل القای بیان پروتئین مخمر X33/pPICZA با فنوتیپ Mut⁺ و استخراج پروتئین آن به روش ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی به عنوان کنترل تیمار گردید. جهت حذف ایمیدازول عمل دیالیز انجام شد.

سلول‌های سرطانی Ramos به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه ظرف ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۱ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه با غلظت‌های مندرج در نمودار ۱ از پروتئین VP2 تیمار و برای هر غلظت کنترل در نظر گرفته شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت، توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (sigma) ارزیابی شد. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول MTT حل شده در محیط RPMI1610 با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر کدام از خانه‌های ۹۶ تایی اضافه شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آنها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه ELIZA reader بررسی و با استفاده از فرمول زیر میزان اندکس تحریک سلول‌ها محاسبه شد.

اندکس تحریک = جذب سلول‌های تحریک شده تقسیم بر جذب سلول‌های تحریک نشده

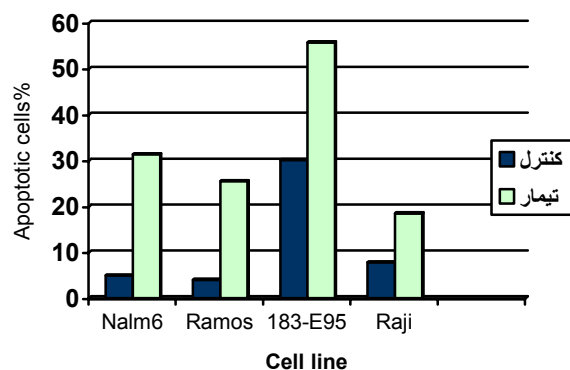
1×10^6 سلول سرطانی Ramos کشت شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با پروتئین VP2 با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه کنترل پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت، با عمل سانتریفوژ (سرعت ۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد) جمع‌آوری و در PBS (Phosphate buffer saline) محتوی ۳/۷٪ پارافرم آلدئید به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند و پس از فیکس شدن در حرارت اتاق، سلول‌ها چند بار با محلول PBS شستشو شدند و سپس با ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ Hoechst در حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۶۰ نانومتر قابل رویت شدند.

1×10^6 سلول از ۴ رده مختلف سلول‌های سرطانی کشت شده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی تحت تیمار با پروتئین VP2 با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به همراه کنترل پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه در مدت زمان‌های ۱۲، ۲۴ و



نمودار ۱- نتایج بدست آمده از سنجش MTT در غلظت‌های مختلف پروتئین نوترکیب VP₂

با توجه به شکل ۵ در رده سرطانی راموس پس از تیمار با پروتئین VP₂ تعداد سلولهای آپوپتوز در مقایسه با کنترل افزایش یافته و با گذشت زمان این میزان بیشتر می‌شود. نمودار ۲ درصد سلولهای آپوپتوز در رده های مختلف سلول سرطانی پس از گذشت ۴۸ ساعت را در مقایسه با کنترل نشان می دهد. تمام ۴ رده سلولی در اثر تیمار با پروتئین، تفاوت معنی داری با کنترل دارند (p < ۰/۰۱).

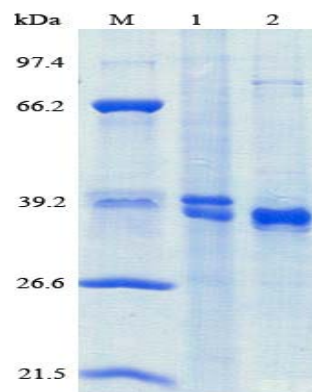


نمودار ۲- نتایج بدست آمده از سنجش درصد سلولهای آپوپتوز رده های سلولی پس از گذشت ۴۸ ساعت

بحث

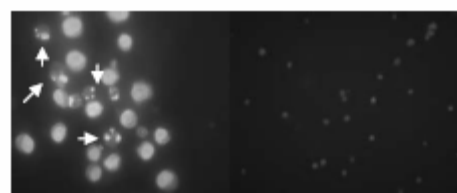
مطالعات انجام شده پیرامون پروتئین‌های ویروس Bluetague (BTV) توسط Mortola و همکاران بیانگر این است پروتئین‌های VP₂ و VP₅ این ویروس قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های پستانداران هستند و با فعال شدن کاسپاز ۳ این عمل انجام می‌گردد (۲۵). در مطالعه‌ای که بر روی آپوپتوزیس القا شده توسط ویروس عامل بورس عفونی انجام پذیرفت، مشخص گردید همواره بین شدت ویروس و شدت تغییرات

برای تخلیص پروتئین VP₂ به انتهای کربوکسیل آن ۶ اسید آمینه هیستیدین اضافه شد و به‌روش IMAC (با استفاده از ستون Ni-NTA) تخلیص شد. در شکل ۳ پروتئین VP₂ با وزن مولکولی حدود ۴۰ kDa همراه با بند پروتئینی دیگری در حدود ۳۵ kDa مشاهده می‌شود. هم‌چنین محصول تخلیص شده از مخمرهای حاوی pPICZA و pPICZA/VP₂ با هم مقایسه شدند.



شکل ۳- مقایسه محصول تخلیص شده از مخمرهای حاوی pPICZA و pPICZA/VP₂ (ردیف M نشانگر وزن مولکولی پروتئین؛ ردیف ۱ محصول تخلیص شده از مخمر X33/pPICZA/VP₂؛ ردیف ۲ محصول تخلیص شده از مخمر X33/pPICZA)

مطابق شکل ۴ سلولهای سرطانی Ramos تحت تیمار با پروتئین نوترکیب VP₂ نسبت به کنترل هسته‌های آپوپتوزی را نشان دادند.

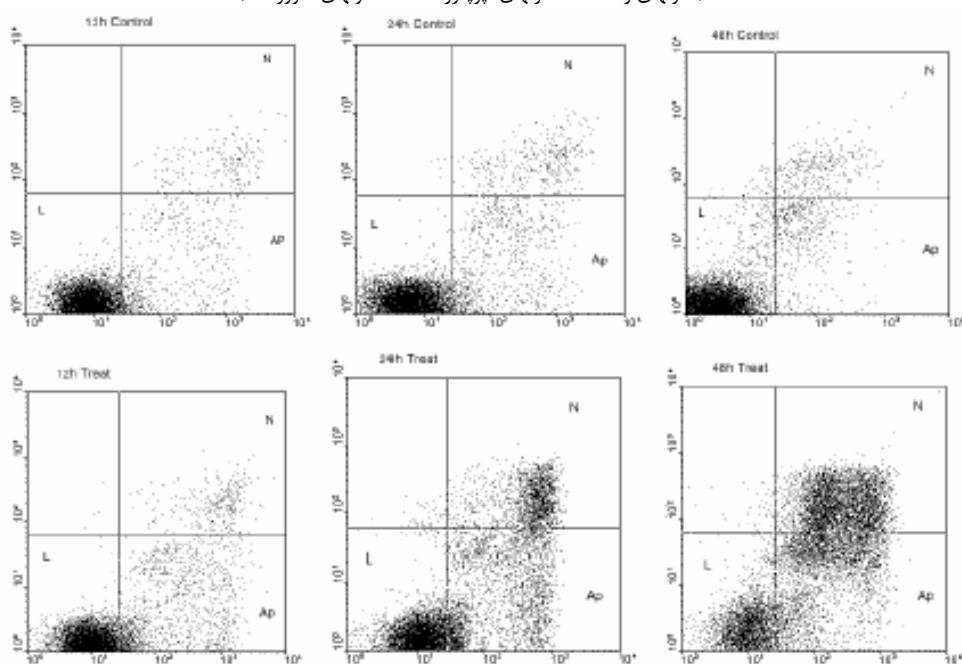


شکل ۴ - عکس رنگ آمیزی با میکروسکوپ فلورسنت: ۱- تیمار با پروتئین VP₂ ۲- کنترل

طبق نمودار ۱ میزان جذب نوری در سنجش MTT در غلظت‌های (۱ و ۱۰۰ میکروگرم و ۱۰۰۰ نانوگرم) تفاوت چندانی با کنترل ندارد اما در غلظت‌های (۱ و ۵ میکروگرم) توان حیاتی سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می دهند (p < ۰/۰۱).

شکل ۵- افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوز در مقایسه با کنترل در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت

(سلول‌های زنده=L، سلول‌های آپوپتوز=AP، سلول‌های نکروز=N)



به‌منظور سهولت در تخلیص، پروتئین VP2 به برچسب هیستیدینی (6XHis) فیوز شد. این برچسب امکان تخلیص فیوژن پروتئین را به‌وسیله ستون IMAC فراهم می‌آورد. براساس نوع پروتئین، برچسب هیستیدینی به انتهای آمینی یا کربوکسیلی متصل می‌شود. قرار دادن برچسب در یک انتها ممکن است باعث پوشیده شدن آن در اثر تاخوردن پروتئین شود. در چنین مواردی برچسب را به انتهای دیگر پروتئین متصل می‌کنند. بر اساس مطالعات قبلی، فیوز کردن برچسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین VP2 با کولوویروس تخلیص آن به‌روش غیر دناتوره را امکان‌پذیر کرده است (۲۶، ۲۷). بر این اساس در پژوهش حاضر برچسب هیستیدینی به انتهای کربوکسیل پروتئین متصل شد.

استفاده از ستون IMAC منجر به خلوص ۱۰۰٪ پروتئین نمی‌شود. زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که به‌طور غیراختصاصی به ستون متصل می‌شوند. این مساله در سیستم‌های یوکاریوتی حادتر است، زیرا یوکاریوت‌ها پروتئین‌های غنی از هیستیدین بیشتری دارند. به همین علت در سلول‌های یوکاریوتی برای کاستن از پروتئین‌های غیراختصاصی، شرایط اتصال به ستون و شستشو با افزایش غلظت NaCl تا ۲M و اضافه کردن دترجنت‌ها مانند Tween 20 سخت‌تر می‌شود. در مطالعه حاضر نیز تخلیص فیوژن پروتئین VP2 با مشکل پروتئین‌های غیراختصاصی مواجه بود

آپوپتوزیس در بورس فابریسیوس ارتباط معنی داری وجود دارد که می‌تواند باعث حضور کافی پروتئین‌های ویروسی و سیتوکین‌ها در بروز آپوپتوزیس سلول‌های لنفوسیتی B باشد (۹) که این موضوع در این مطالعه نیز مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه ما برای اولین بار مشخص گردید، پروتئین حاصل از کلونینگ ژن VP2 از ویروس IBDV قادر است به تنهایی در *in vitro* در سلول‌های سرطانی لنفوسیت B آپوپتوز را القا نماید. برای افزایش دقت در تشخیص آپوپتوزیس از روش دقیق فلوسایتومتری با Annexin-V-fluorescein استفاده شد. در طول مراحل اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین (PS) بر روی سطح سلول ظاهر می‌شود. اساس این روش ترکیب پروتئین اتصالی وابسته به کلسیم Annexin V به فسفولیپیدهای غشایی است. این پروتئین تمایل بسیاری به PS دارد. در کیت‌های تشخیصی این پروتئین با مواد نشان‌دار مختلف و یا کروموفسفر برای سهولت در تشخیص به کار می‌رود. با بهره‌گیری از این روش، آپوپتوز در مراحل اولیه و سلول‌های زنده قابل تشخیص هستند. به این نکته باید اشاره کرد که سلول‌های نکروتیک نیز در سطح خود مولکول‌های PS را عرضه می‌کنند. از آنجایی که سلول‌های نکروتیک تمامیت غشاء خود را از دست می‌دهند، با همراه کردن رنگی مانند یدید پروپایدوم با Annexin V می‌توان این دو مرحله را از هم تشخیص داد.

چپرون‌های داخل سلولی می‌باشد. بنابراین بیان هم‌زمان پروتئین VP2 و چپرون‌های سلولی در E.coli جهت تقویت سیستم تازدن پروتئین‌ها پیشنهاد می‌شود. امید است با افزایش هر چه بیشتر مطالعات در زمینه اثر پروتئین VP2 و ویروس بورس عفونی بر سلول‌های سرطانی، اطلاعات هر چه مفیدتری در خصوص درک چهره واقعی اثر آن حاصل گردد تا در آینده بتوان از آن در درمان بیماری‌ها استفاده کرد.

که با سخت‌تر کردن شرایط تخلیص تا حدی از این مشکل کاسته شد. پروتئین متصل‌شده به ستون IMAC از طریق کاهش pH و یا افزایش غلظت ایمیدازول خارج می‌شود. از آنجایی که تاثیر تغییرات pH روی ساختار پروتئین VP2 مشخص نبود، از روش دوم که مبتنی بر افزایش غلظت ایمیدازول بود استفاده شد. سادگی و کم‌هزینه بودن سیستم-های بیان پروکاریوتی، تولید پروتئین VP2 را در آنها توصیه می‌کند. البته تاخوردن این پروتئین در پروکاریوت‌ها با مشکلاتی همراه است که احتمالاً ناشی از کمبود غلظت

REFERENCES

- Martinez-Torrecuadrada JL, Saubi N, Pages-Mante A, Caston JR, Espuna E, Casal JI. Structure-dependent efficacy of infectious bursal disease virus (IBDV) recombinant vaccines. *Vaccine* 2003; 21: 3342-50.
- Kuo PL, Lin CC. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate inhibits hep G2 cell proliferation and induces apoptosis through p53-dependent and fas-mediated pathways. *J Biomed Sci* 2003;10(2):219-27.
- Azad AA, McKern NM, Macreadie IG, Failla P, Heine HG, Chapman A, et al. Physicochemical and immunological characterization of recombinant host protection antigen (vp2) of infectious Bursal disease virus. *Vaccine* 1991;9:715-72.
- Dobos P. Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology* 1995;208:19-25.
- Annet J, Nieter H, Muller H. Apoptosis induced by IBDV replication in productively infected cells as well as in antigen-negative cells in their vicinity. *J virol* 2001;82:1107-15.
- Yao K, Vakharia VN. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kda nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology* 2001;285:50-58.
- Yehuda H, Pitcovski J, Michael A, Gutter B, Goldway M. Viral protein 1 sequence analysis of three infectious bursal disease virus strains: a very virulent virus, its attenuated form, and an attenuated vaccine. *Avian Dis* 1999;43:55-64.
- Fernandez A, Martinez S, Rodriguez JF. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol* 1997;71(10):8014-18.
- دوستار ی، نقشینه ر، طروق ی، هاشمی م، رهبرقاضی ر. مطالعه آزمایشی آپوپتوزیس القا شده توسط ویروس عامل بورس عفونی به روش تائل. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴؛ دوره ۶، شماره ۴، صفحات ۳۱۳ تا ۳۲۰.
- Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. fas and fasl in the homeostatic regulation of immune responses. *Immuol Today* 1995;16:569-74.
- Nozawa K. Soluble fas (apo- 1, CD95) and soluble fas lig and in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1997;40:1126-29.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
- Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: Potten CS (Ed). *Perspectives on mammalian cell death.*, Oxford: Oxford University Press; 1987: 93.
- Boot HJ, Huurne AA, Hoekman AJ, Peeters BP, Gielkens AL. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *J Virol* 2000;74:6701-11.
- Ogawa M, Yamaguchi T, Setiyono A, Ho T, Matsuda H, Furusawa S, et al. Some characteristics of a cellular receptor for virulent infectious bursal disease virus by using flow cytometry. *Arch Virol* 1998;143:2327-41.
- Ogawa M, Nakamura S, Atsuchi T, Tamiya T, Tsuchiya T, Nakai S. Macromolecular antimicrobial glycoprotein, achacin, expressed in a methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* 1999;448:41-44.
- Azad AA, Jagadish MN, Brown MA, Hudson PJ. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus. *Virology* 1987;161:145-52.

18. Von Einem UI, Gorbalenya AE, Schirmeier H, Behrens SE, Letzel T, Mundt E. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 2004;85:2221-29.
19. Dallaporta B, Marchetti P, de Pablo MA, Maisse C, Duc HT, Metivier D, et al. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. *J Immunol* 1999;162(11):6534-42.
20. Durant S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. *Cell Immunol* 1986;102(1):136-43.
21. Ye X, Georgoff I, Fleisher S, Coffman FD, Cohen S, Fresa KL. The mechanism of epipodophyllotoxin-induced thymocyte apoptosis: possible role of a novel Ca(2+)-independent protein kinase. *Cell Immunol* 1993;151(2):320-35.
22. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.
23. Tong L, Shen JG, Qiu XS. Study on preventive effect of buyang huanwu decoction on cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia-reoxygenation in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2002;22(7):522-24.
۲۴. شمس آرا م. بیان پروتئین ویروس بیماری بورس عفونی و بررسی ایمنی زایی آن در فیبروبلاست جنین جوجه. پایان نامه دکتری ژنتیک مولکولی، تهران، دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۸۵.
25. Mortola M, Noad R, Roy p. Bluetangue virus outer capsid protein are sufficient to trigger apoptosis in mammalian cells. *J Virol* 2004;78(6):2875-83.
26. Wang MY, Kuo YY, Lee MS, Doong SR, Ho JY, Lee LH. Self-assembly of the infectious bursal disease virus capsid protein, rVP2, expressed in insect cells and purification of immunogenic chimeric rVP2H particles by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Biotechnol Bioeng* 2000 ;67:104-11.
27. Wang P, Zhang J, Sun ZY, Chen YH, Liu JN. Glycosylation of prourokinase produced by *Pichia pastoris* impairs enzymatic activity but not secretion. *Protein Expr Purif* 2000;20:179-85.