

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

چکیده

نرمین قادری^{*۱}

خسرو عیسی زاده^۱

علیرضا شعاع حسینی^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، گیلان،
ایران.

۲- گروه بافت‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی
تهران، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در
پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، ولنجک، بلوار دانشجو، میدان
یاسمن، خیابان عدالت، پلاک ۳.

تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۱۶۱۴۱

E-mail: narminghadari@yahoo.com

مقدمه

آپوپتوز در بسیاری از سلول‌های انسانی به‌وقوع می‌پیوندد تا جلوی توموری شدن سلول‌ها را بگیرد از طرفی چنین مکانیسمی در شیمی‌درمانی برای از بین بردن سلول‌های بدخیم بسیار مهم است. پروتئین آپوپتین، قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های ملانوما، هپاتوما، لنفوما، کولانژیوکارسینوما، کارسینوما روده‌ای و سرطان ریه می‌باشد.^{۱-۳}

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

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

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

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

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

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

دلیل نام‌گذاری آپوپتین به این خاطر است که این پروتئین قادر به القای آپوپتوز در سلول‌های توموری انسان است. آپوپتین پروتئینی با ۱۲۱ اسید آمینه می‌باشد که از ویروس آنمی مرغ (CAV) به‌دست آمده است.^۴ این ویروس یکی از کوچک‌ترین ویروس‌های مرغ است که در سلول‌های سالم قادر به رشد نمی‌باشد. ژنوم این ویروس سه پروتئین را کد می‌نماید (VP1-3)^۵ که VP3 را آپوپتین می‌نامند.^۵ فعالیت آپوپتوزی آن با توانایی قرارگیری در هسته‌ی سلول مرتبط است ولی در سلول‌های طبیعی این پروتئین در سیتوپلاسم باقی

برای الکتروپوریشن مورد استفاده قرار گرفت. ژن آپویتین، هدیه‌ای از دانشکده Leiden هلند بود.

سلول‌ها و کشت سلولی: رده‌های سلولی سرطان سینه (BT-474, Pasture MDA-MB-361, SKBR-3, UACC-812 and ZR-75) Institute, Tehran, Iran و سلول‌های بنیادی اندومتروم انسانی (Lonza Clonetics, USA) در محیط کامل (RPMI 1640 Invitrogen, USA) و DMEM/F12 (Gibco, UK) که حاوی ۱۰٪ سرم جنین گوساله (FBS, Gibco, UK) بود در ۳۷ °C و پنج درصد CO₂ 5 کشت داده شدند.

تکثیر و کلونینگ ژن آپویتین: پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن آپویتین، از روی توالی‌های GeneBank (NC-001427) طراحی شد و توسط (Cinnagen Inc, Tehran, Iran) سنتز گردید. سایز محصولی که انتظار می‌رفت ۳۹۶ bp بود. مخلوط واکنش PCR حاوی ۲ mM MgCl₂، ۲۰۰ mM dNTPs و ۲۰ pmol از پرایمرها بود. Taq پلیمرز (۱ unit, Promega, USA) و ۵ ng DNA الگو در نهایت به حجم کلی ۲۵ µl رسید. واکنش در یک ترموسایکلر اتوماتیک (Peq Lab, Germany) با سه دقیقه زمان دناتوراسیون اولیه (۹۴ °C)، ۳۵ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت یک دقیقه، به منظور جداسازی دو رشته و سپس اتصال پرایمر به رشته، دمای ۶۰ °C به مدت یک دقیقه در نظر گرفته شد، طویل شدن در دمای ۷۵ °C به مدت یک دقیقه و طویل‌سازی پایانی در دمای ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه بود. محصول خالص به دست آمده از PCR توسط Kit extraction-gel (QIAex II, Qiagen) جدا شد. آپویتین به دست آمده از PCR طبق دستورالعمل شرکت سازنده به درون pCR2.1 کلون گردید (Invitrogen, USA). پلاسمیدها به روش الکتروپوریشن به *E. coli* DH5 α انتقال داده شدند. cDNA آپویتین که به وکتور pCR2.1 کلون شده بود توسط هضم آنزیمی محدودکننده و توالی‌یابی DNA تأیید گردید. قطعه‌ی داخل شده به pCR2.1 توسط آنزیم محدودکننده *BamH-I* و *HinD-III* درون بافر تانگو آزاد شد و از ژل خالص گردید (دمای ۴ °C، ۱۲ ساعت). قطعه یادشده به درون وکتور بیانی λ ZAP-CMV (Stratagene, USA) وسط همین برش آنزیمی افزوده شد و توسط 2U از T4 DNA لیگاز (Fermentas, USA) و ۱۰/۵ µl از ۱۰ mM ATP (Invitrogen, USA) لیگاسیون انجام شد. سپس به DH5 α وارد شد و همان‌طور که پیش از این شرح داده شده بود

می‌ماند و وارد هسته نمی‌شود.^{۸۳} امکان وارد ساختن ژن آپویتین در وکتورهای مختلفی نظیر ویروس‌های پاپیلوما، پاروو، پولیوما و آدنو^{۸۴} موجب شده تا این پروتیین برای درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد. به منظور استفاده از آپویتین در درمان سرطان، رسانش و بیان کارآمد آن به درون سلول‌های سرطانی بسیار مهم است.

باکتریوفاژها تنها قادر به آلوده‌سازی باکتری‌ها می‌باشند.^{۱۱} این عوامل به شدت اختصاصی بوده و هر یک از آن‌ها قادر به آلوده‌سازی تنها یک سویه‌ی خاص از باکتری می‌باشد. لامبدا (λ) فاژی است معتدل با ژنوم DNA دو رشته‌ای (۵۰ kb) و از گلیکوپروتیین‌های E و D که پوشش آن هستند تشکیل شده است.^{۱۲} با تشکیل ۴۰۰ کپی از گلیکوپروتیین D، کپسید شکل می‌گیرد.^{۱۳} باکتریوفاژ لامبدا دارای ظرفیت تکثیر و درجه پایداری بالا، فرآیند تولید سریع و ارزان‌قیمت و ایمنی زیستی در سلول‌های انسانی می‌باشند.^{۱۵،۱۴} باکتریوفاژها را به عنوان وکتوری ضعیف به منظور رسانش ژن در سلول‌های انسانی می‌شناختند^{۱۶} اما ساخت وکتورهای فاژمیدی، دست‌کاری آن‌ها را آسان ساخت.^{۱۷}

فاژدرمانی زمینه‌ای جالب و کاربردی در درمان سرطان می‌باشد ولی اطلاعات اندکی در مورد بیان ژن‌ها به واسطه‌ی فاژها در سلول‌های یوکاریوتی در دسترس می‌باشد.^{۱۸} به همین دلیل مطالعات ما بیان آپویتین به واسطه‌ی باکتریوفاژ لامبدا را در رده سلولی یوکاریوتی از نوع رده سلولی BT-474 سرطان سینه انسانی و تومور حاصل از آن در موش‌های Nude را هدف قرار داده است.

روش بررسی

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

محیط کشت و سویه‌ها: باکتری (Pasture Institute, Tehran) *Escherichia coli* DH5 α Iran به عنوان میزبان فاژی جهت تیتراسیون و تکثیر مورد استفاده قرار گرفت. محیط (Sigma-Aldrich, USA) Luria-Bertani (LB) به منظور انتخاب فاژهای ترانسفورم شده به کار گرفته شد. محیط (M9 Supplemented with ampicillin and IPTG)

برای جداسازی تک‌کلنی‌ها کشت داده شد.^{۱۹} طول‌سازی در دمای °C ۱۲ به مدت چهار ساعت انجام پذیرفت. کشت در محیط حاوی آمپی‌سیلین صورت گرفت و انتخاب تک‌کلنی با استفاده از نوک پپیت پاستور انجام شد.

نو ترکیب سازی ذره فازی: به منظور تولید فاج لامبدای نو ترکیب، *E. coli* DH5α با یک MOI از فاجها (Lambda, Nanjing, China) تلقیح گردید و بعد از دو ساعت انکوباسیون در °C ۳۷ با ۱۰ μg آپوئین-λZAP-CMV الکتروپوریت (Electroporation) (ایجاد منفذ با جریان الکتریکی) شد. وکتور بیانی آپوئین-λZAP-CMV به این مخلوط اضافه گردید. به این صورت که لوله‌ی حاوی آپوئین-CMV-λZAP در دمای اتاق به مدت دو ساعت انکوبه شد. ۱ ml از بافر فازی {حاوی: ۵/۶ g NaCl، ۲/۰ g MgSO₄، ۷ H₂O، ۷/۵ M Tris- V/۵ gelatin ۲/۲ (w/v) in ۱۱ distilled water}، ۵۰/۰ ml ۱/۰ HCl (pH ۵/۰ ml به این لوله اضافه گردید. بعد از این مرحله، ۲۰ μl کلروفورم (Sigma, USA) به مخلوط اضافه شد و با مابقی مواد درون لوله به طور کامل مخلوط گردید. این لوله به طور مداوم چرخانده شده و محلول رویی حاوی فاج برای تیتراسیون آماده شد. فاج از طریق کشت دادن DH5α روی پلیت آگار (Gibco, USA) بر اساس دستور مربوطه (شرکت تولیدکننده) تیتر گردید. مقدار زیادی از فاج λ حاوی وکتور بیانی آپوئین-λZAP-CMV به یک لیتر از محیط M9 حاوی آمپی‌سیلین وارد شد. بعد از ۲۴ ساعت محیط با اضافه نمودن یک میلی مول IPTG القا گردید و ۷۲ ساعت انکوبه شد. کشت القاشده با دور ۸۵۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاج موجود در این عصاره از طریق کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شد. در نهایت یک کلون از این فاجها جهت بیان ژن آپوئین انتخاب گردید.

مطالعات بیان آزمایشگاهی: رده‌های سلولی MDA-BT-474، MB-361، SKBR-3، UACC-812 و ZR-75 انسانی در دو محیط کامل RPMI-1640 (BT-474، SKBR-3، ZR-75) و DMEM (MDA-MB-361، UACC-812) در فلاسک‌های ۷۵ کشت داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت به ۸۰٪ تراکم رسیدند. سلول‌های اندومتریم انسانی کشت داده شده در DMEM/F12 بعد از گذشت ۳۶ ساعت به چنین تراکمی می‌رسیدند لذا آنها زودتر کشت داده شدند. رقت-های فازی سریالی از ۱۰^{-۸} تا ۱۰^{-۱۲} در بافر کلسیم آماده شدند (۲ mM CaCl₂، ۱۵۰ mM NaCl، ۱۰ mM HEPES، ۱۰ mM Na₂CO₃، ۳ mM NaHCO₃)

۷ pH). سلول‌های تک‌لایه‌ای از پلیت‌ها برداشته شده، به میکروتیوب‌ها انتقال داده شدند و سپس نانوزیست ذرات لامبدای حاوی کاست آپوئین-λZAP-CMV بدان تلقیح گردید. سپس مواد داخل میکروتیوب به خوبی با هم مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس مخلوط در پلیت‌های شش‌خانه‌ای حاوی ۵٪ FBS همان‌طور که پیش‌از این توضیح داد شد، کشت داده شدند. بعد از چهار ساعت انکوباسیون، محیط اطراف سلول را برداشته و بدان محیط تازه اضافه شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط را به طور کامل حذف نموده؛ از این سلول‌ها برای آنالیز وسترن بلات، RT-PCR و آنالیز سیتوشیمیایی استفاده شد.

شناسایی آپوئین پس از رسانش با فاج نو ترکیب توسط RT-PCR: سلول‌های میزبان ترانسفکت شده دو بار توسط PBS شسته شدند و RNA تام با استفاده از کیت استخراج RNeasy (Qiagen, Germany) RNA با توجه به دستور مربوطه استخراج گردید.^{۲۰} یک میکروگرم از RNA تام بر طبق دستور شرکت سازنده توسط آنزیم ترانسکریپتاز سوپراسکرپت ریورس (Invitrogen, USA) به cDNA رونویسی شد. به منظور آنالیز RT-PCR، ۵ μg RNA کل با استفاده از ریورس ترانسکریپتاز MMLV (Promega, USA) رونویسی معکوس شد. RNA معادل cDNA (۵۰۰ ng)، با استفاده از Taq DNA پلیمراز با ۳۰ چرخه تحت شرایط ذیل تکثیر داده شد:

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

آنالیز وسترن بلات به منظور شناسایی آپوئین: ۳۶ ساعت بعد از ترانسفکت نمودن سلول‌ها توسط نانوزیست ذره‌ی لامبدای نو ترکیب، همان‌طور که قبل تر توضیح داده شد، این سلول‌ها طبق پروتکل‌های قبلی مورد آنالیز لکه‌گذاری قرار می‌گیرند.^{۲۱}

سلول‌ها را با بافر فسفات شست و شو داده و سپس آن‌را به ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده ۵۰ mM Tris، ۷/۴ pH NaCl، ۲۵۰ mM EDTA، ۵ mM β-glycerophosphate، ۲۰ mM Triton X-100، ۱/۸٪ phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride، ۱ mM inhibitor انتقال داده، در یک میکروتیوب ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار می‌گیرد. نمونه‌ها در بافر نمونه (۵۰ mM Tris، ۷/۴ pH، ۲٪ SDS، ۱/۲٪ bromophenol blue، ۱۰۰ mM dithiothreitol) قرار می‌گیرند.

تحت شرایط یکسان با موش‌های تلقیحی نگاه‌داری شدند. پس‌از تومورزایی، این موش‌ها به سه دسته تقسیم شدند و به گروه اول باکتريوفاژهای نوترکیب حامل آپوپتین تزریق گردید. به گروه دوم باکتريوفاژهای معمولی تزریق شد و به گروه سوم تنها فسفات بافر سالین تزریق گردید. این تزریق به مدت دو بار در هفته تا مدت زمان ۹۰ روز در موش‌هایی که زنده بودند ادامه یافت. وزن این موش‌ها و اندازه تومور موجود در آن‌ها نیز هفته‌ای دو بار به صورت مرتب اندازه‌گیری شد.

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

یافته‌ها

تولید باکتريوفاژ بیان‌کننده آپوپتین: به منظور تولید فاژ لامبدای بیان‌کننده آپوپتین، این ژن به درون پلاسمید نوترکیب λ ZAP-CMV وارد گردید. الگوی هضم اندونوکلاز محدودکننده نشان داد که آپوپتین به درستی به درون وکتور وارد شده است. پس‌از این مرحله پلاسمید نوترکیب آپوپتین- λ ZAP-CMV به درون فاژ لامبدا توسط کیت بسته‌بندی وارد گردید و بعد از آن به رده سلولی کارسینوماي BT-474 منتقل شد.

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

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

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

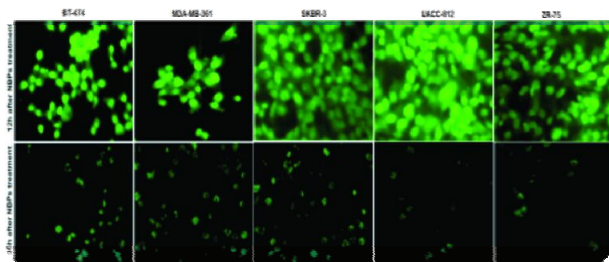
اثر ضد نئوپلاستیکی فاژ نوترکیب: اثر آپوپتین در سلول‌های ترانسفکت‌شده توسط فاژ نوترکیب نیز مورد آزمایش قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها را روی لام کشت داده شده و پس‌از پر شدن با نانویست ذرات نوترکیب ترانسفکت شدند. ۴۸ ساعت پس‌از آن، سلول‌ها توسط پروپیدوم دید (PI) رنگ‌آمیزی شدند. این سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با میکروسکوپ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

آزمون رنگ‌سنجی MTT:

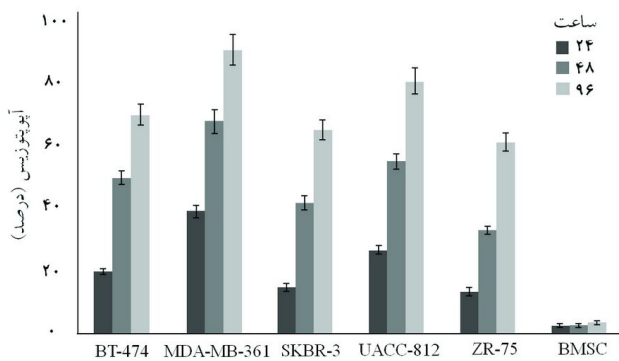
سنجش MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma, USA) به منظور پیدا شدن قابلیت حیاتی سلول‌ها بعد از انتقال نانو ساختارهای نوترکیب انجام پذیرفت. تمام انواع سلول‌های میزبان یک‌روز قبل از انتقال با نانویست ذرات لامبدای نوترکیب در پلیت‌های ۹۶ تایی کشت داده شدند.

قابلیت حیاتی سلول در طول ۷۲ ساعت و هر ۱۲ ساعت یک‌بار توسط ۲۰ میکرولیتر MTT چک شد و آن‌ها به مدت چهار ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند تا اجازه متابولیزاسیون به MTT داده شود. سپس محیط کشت تخلیه شده و کریستال‌های ایجاد شده با اضافه نمودن $100 \mu\text{l}$ دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO, Merck, Germany) برای هر خانه، حل گردیدند. میزان جذب در 490 nm توسط الیزاخوان اندازه‌گیری شد. سلول‌های تیمارنشده به عنوان کنترل مد نظر قرار گرفتند.

آزمایش در شرایط محیط زنده: در این آزمایش از ۳۲ سر موش Nude استفاده شد. به ۲۷ سر از موش‌ها سلول‌های BT-474 تلقیح گردید. البته قبل از تلقیح قرص‌های حاوی استروژن در زیر پوست این موش‌ها کاشته شده بود. پنج عدد از موش‌ها به عنوان کنترل منفی

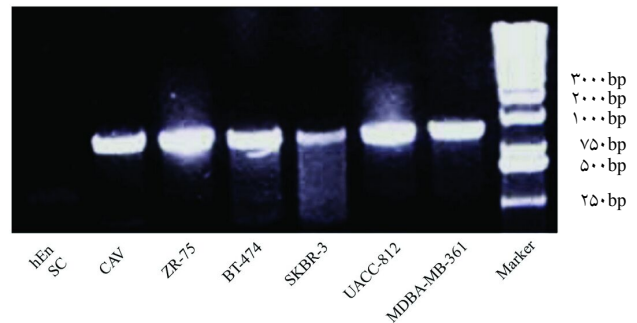


شکل ۳: رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت پروپیدیوم دید در سلول‌های ترانسفکت شده با ساختار باکتریوفاژی بیان‌کننده آپوپتین. بیان هسته‌ای آپوپتین و تغییرات مورفولوژیکی در اثر آپوپتوزیس پس از ۴۸ ساعت در قسمت پایین دیده می‌شود و سلول‌هایی که هنوز قادر به بیان آپوپتین و استقرار هسته‌ای آن نیستند تنها ۱۲ ساعت پس از تیمار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

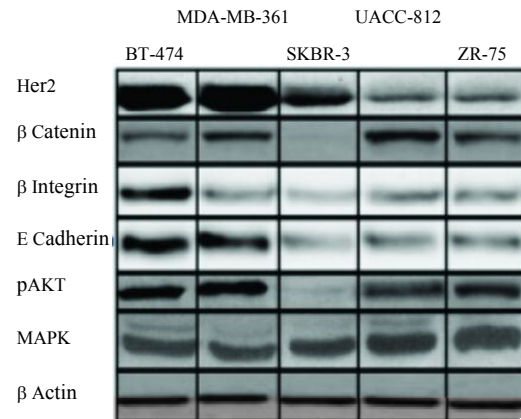


شکل ۴: بررسی قابلیت حیاتی سلول‌ها پس از ترانسفکت نمودن با ساختار فاژ لامبدا نوترکیب. تیمار پس از ۹۶ ساعت نشان‌دهنده مرگ سلول‌های سرطانی به طور معنادار بود.

هدف مشخص ساخت (شکل ۳). رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت با استفاده از آنتی‌سرم پلی‌کلونال در سلول‌های ترانسفکت شده با باکتریوفاژ لامبدا بیان‌کننده آپوپتین، بیان هسته‌ای آپوپتین و تغییرات مورفولوژیکی در اثر آپوپتوزیس، را نشان داد (شکل ۳). این مطالعه به صورت آشکارا مشخص ساخت که آپوپتین توسط باکتریوفاژ لامبدا نوترکیب که حامل آپوپتین-CMV- λ ZAP است، بیان می‌شود. چنین تغییراتی در سلول‌های تیمار شده‌ی EnSC توسط ساختار لامبدا نوترکیب مشاهده نشد.



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



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

آپوپتین را بیان نمود، BT-474 ترانسفکت نشده که به عنوان کنترل منفی قرار گرفته بود چنین حالتی نداشت. هم‌چنین سلول بنیادی کنترل هم‌میزان بسیار پایینی از بیان آپوپتین را داشت (شکل ۲). اثر ضد نئوپلاستیکی آپوپتین حاصل از رسانش باکتریوفاژ لامبدا: اثر ضد نئوپلاستیکی آپوپتین بیان شده توسط باکتریوفاژ لامبدا با بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول بیان‌کننده‌ی آن مشخص گردید. این روش بیان آپوپتین و جای‌گیری درون سلولی آن را در سلول‌های

قرار گرفته بود، بررسی شد. این باکتریوفاژ لامبدا که برای اولین بار توسط گروه تحقیقاتی ما طراحی شد به صورت انتخابی بر روی سلول سرطانی تأثیرگذار بوده و هیچ اثر ممانعت‌کنندگی بر روی سلول‌های سالم ندارد.

آپوپتین پروتئینی ضدسرطانی است که به‌تازگی کشف شده و پتانسیل بسیار بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد.^{۲۲،۲۳} این پروتئین مسیر کلاسیک آپوپتوز را القا می‌نماید^{۲۳} ولی در سلول‌های اولیه، درون سیتوپلاسم باقی می‌ماند و این در حالی است که در سلول‌های سرطانی به هسته نفوذ کرده و آپوپتوز را از مسیر میتوکندریایی القا می‌نماید.^{۲۴} با این وجود سیستم‌های کارآمدی نیاز است تا آپوپتین را به سلول سرطانی برساند و یا کاست ژنی آن درون این سلول‌ها بیان شود. پیشنهاد ما برای این رسانش و بیان استفاده از یک باکتریوفاژ لامبدا بود. در این تحقیق، ساختار و خصوصیات یک باکتریوفاژ لامبدای نوترکیب برای رسانش ژن آپوپتین و بیان آن در سلول‌های BT-474 سرطان سینه‌ی انسانی آن‌هم در شرایط درون تنی توسط گروه تحقیقاتی ما گزارش شده است.

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

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

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

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

بحث

این تحقیق به بررسی رسانش یک پروتئین ضدسرطانی ویروسی آن هم توسط یک باکتریوفاژ پرداخته شد. سلول سرطانی BT-474 از نوع سرطان سینه انسانی هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* که با پروتئین آپوپتین درون فاژ لامبدای نوترکیب مورد تیمار

مقایسه با سلول‌های سالم کاهش نشان می‌داد ($P \leq 0.05$). تاکنون هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر استفاده از باکتروفاز لامبدا جهت رسانش و بیان آپوپتین در دسترس نبوده ولی برخی گروه‌ها از آدنوویروس‌ها برای انتقال این عامل و در نتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های کلانژیوکارسینومای استفاده کرده‌اند.^{۲۹} هم‌چنین گزارشی موجود است که در آن تکثیر و کتورهای آدنوویروسی بیان‌کننده آپوپتین، اثرات ضدتوموری خوبی بر روی زئونگرافت هپاتوما نشان دادند و در برخی موارد این هپاتوما به‌طور کامل برگشت داشت.^{۳۰}

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

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

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

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

باکتروفاز لامبدا طراحی شده توسط گروه ما که قادر به کد نمودن ژن آپوپتین بود، پس از ورود به درون سلول میزبان این قدرت را یافت تا سنتز mRNA را در هسته‌ی سلول‌های سرطانی انجام دهد و این پروتیین را به‌شکل کارآمدی در سلول‌های سرطانی انسان بیان کند. در سال ۲۰۰۷، دانشمندان سلول‌های ملانوما را با فازهای مهندسی‌شده، تیمار نمودند که قادر به تجمع درون سلول میزبان یوکاریوتی بودند و برخی ژن‌ها را نیز بیان می‌نمودند.^{۲۸} همین‌طور در آزمایش ما نیز باکتروفازهای حامل ژن آپوپتین قادر بودند آنرا به رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه انسان برسانند که در آنجا فرم عملکردی این پروتیین بیان می‌شد. این روند در درون بدن موش‌های Nude هم دیده شد و میزان رشد تومور را تا مقدار زیادی کاست و میزان مرگومیر را در آن‌ها به شدت کاهش داد. این روش و رویکرد بر پایه‌ی فعالیت اختصاصی علیه تومور جهت درمان سرطان غیرمعمول می‌باشد. جالب است که باکتروفاز نوترکیب لامبدا برای سلول‌های سرطانی هدفمند نشده بود ولی بیان اندکی در سلول‌های نرمال داشت. آپوپتوز تنها در سلول‌های سرطانی القا می‌شد و دلیل این امر، جای‌گیری درون سلولی متفاوت پروتیین آپوپتین در سلول‌های سرطانی و سالم بود. در سلول‌های طبیعی آپوپتین اغلب در سیتوپلاسم جای گرفته اما در سلول‌های سرطانی وارد هسته می‌شود.^{۸۷}

با وجود آن‌که آپوپتین به‌صورت انتخابی مرگ را در رده‌های سلولی BT-474 القا نمود، در مقابل، سلول‌های طبیعی EnSC هیچ‌گونه فعالیت آپوپتوزی از خود نشان ندادند و همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شد، قابلیت حیاتی سلول سرطانی تیمار شده با باکتروفاز حامل آپوپتین-λZAP-CMV به‌شکل قابل‌ملاحظه‌ای در

References

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

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

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

Narmin Ghaderi M.Sc.^{1*}
Khosro Esazadeh Ph.D.¹
Alireza Shoaie Hasani Ph.D.²

1- Department of Microbiology,
Faculty of Science, Islamic Azad
University Lahijan Branch, Gilan,
Iran.

2- Department of Stem Cell and Tissue
Engineering, Research Center
for Science and Technology in
Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

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

Abstract

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

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

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

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

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

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