ارزیابی اثرات تحریکی پروتیین Tax ویروس HTLV-I بر مسیرهای سیگنالینگ وابسته به CREB وNFkB با استفاده از دو پلاسمید جدید ریپورتر مبتنی بربیان آنزیم بتاگالاکتوزیداز

کیهان آزادمنش M.D☆★♦، فرزین روحوند Ph.D☆، صفیه امینی Ph.D☆
آرش آرش‌کیا Ph.D☆، میرداد کازانجی Ph.D☆
☆ انیستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز
★ فرانسه، انیستیتو پاستور گویان، آزمایشگاه رتروویرولوژی
♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۴، انیستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز
پست الکترونیک: Email:azadmanesh@pasteur.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۱/۳، پذیرش مقاله: ۸۳/۱۲/۳

* **هدف:** ساخت دو پلاسمید ریپورتر برای بررسی اثرات پروتیین Tax ویروس HTLV-I بر مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی که ازدو پروتیین CREB و NFkB استفاده می کنند

* **مواد و روشها:** پس از انتقال ژن بتاگالاکتوزیداز باکتریایی و سیگنال پلی‌آدنیلاسیون ژن BGH به پلاسمید pUC18، نواحی پروموتری HTLV-I LTR و Human IL2 Receptor alpha با PCR تکثیر و به پلاسمید اخیر منتقل شدند. برای ارزیابی میزان تحریک این پروموترها، پس از ترانسفکشن سلولهای 293T با پلاسمیدهای ساخته شده و پلاسمید بیانی HTLV-I Tax، روشهای رنگ آمیزی با X-gal، الایزا و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز در مصرف سوبسترای CPRG، آماده و مورد مقایسه قرار گرفت.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که پلاسمیدهای ساخته شده به خوبی به تحریک با Tax پاسخ داده و بتاگالاکتوزیداز تولیدی با هر سه روش قابل ارزیابی است. دو روش الایزا و فعالیت سنجی همبستگی بسیار بالایی (r=۰/۹۴۹) را نشان داد.

* **نتیجه گیری:** هر دو پلاسمید ساخته شده در این تحقیق قادر به افزایش بیان قابل توجه بتاگالاکتوزیداز پس از تحریک با HTLV I Tax هستند. مزایای روشهای مختلف ارزیابی بیان مورد مقایسه قرار گرفت.

گل واژگان: ویروس لمفوتروپیک سلولهای T، آنزیم بتاگالاکتوزیداز، ژنهای گزارشگر، پروتیین چسبنده به عنصر پاسخ به سیکلیک AMP، فاکتور هسته‌ای کاپا- ب

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۲۵ ـ ۲۱۸

مقدمه

سیگنالینگ داخل سلولی مجموعه پیچیده‌ای از میانجیهای مختلف را شامل می گردد که با مکانیسمهایی نظیر فسفریلاسیون، دفسفریلاسیون، تغییر در غلظت داخل سلولی یونهای مختلف، آزادسازی یا مهار آزادسازی برخی پروتیینها، تغییر درونویسی یا بیان پروتیینهای مختلف و غیره (۱، ۲، ۳) پاسخهای سلول را نسبت به محرکهای مختلف کنترل می‌نمایند. بسیاری از سرطانها درنتیجه تغییر در سیستمهای سیگنالینگ داخل سلولی همراه با رشد بی‌رویه سلولها ایجاد می‌شوند(۴). بسیاری از ویروسها نیز برای وادار نمودن سلول به تولید فرآورده‌های ویروسی از مداخله در چنین سیستمهایی بهره می‌برند و گاه باعث ایجاد سرطانهای وابسته به ویروس نظیر لمفوم بورکیت(EBV)، سرطان دهانه رحم(HPV)، سرطان کبد(HBV, HCV) می‌شوند(۵، ۶، ۷، ۸).

ویروس HTLV-I(Human T Lymphotropic Virus type I) یک رتروویروس شایع در استان خراسان ،ژاپن ، حوزه کارائیب و قسمتهای دیگری از جهان است که عامل شناخته شده لوسمی/ لمفوم سلولهای T بالغین و نوروپاتی وابسته به HTLV-I است (۹، ۱۰). این ویروس پروتیینهای مختلفی تولید می‌نماید که هر یک در پاتوژنز و ایمنی‌زایی علیه آن نقشهای مختلفی دارند. گرچه اغلب واکسنهای ویروسی با استفاده از پروتیینهای ساختاری ویروس (نظیر Envelop یا Capsid) و به منظور تولید آنتی‌بادیهای محافظت کننده طراحی می‌شوند، ولی نحوه گسترش و انتقال HTLV-I که از طریق انتقال سلولهای آلوده و تماس سطحی سلولها با یکدیگر است نقش ایمنی هومورال را در کنترل آن کمرنگ نموده است. در مقابل نشان داده شده است که پاسخ ایمنی سلولی نقش مهمی در کنترل عفونت و جلوگیری از بیماری‌زایی آن در افراد ناقل دارد. همچنین دیده شده است که بیشترین پاسخ ایمنی علیه پروتیین Tax این ویروس است (۱۱). این پروتیین یکی از حفاظت شده ترین قسمتهای ویروس در بین سویه‌های مختلف آن است (۱۲) که با کمک سیستم سیگنالینگ CREB(Cyclic AMP Response Element Binding Protein) و اثر بر LTR(Long Terminal Repeat) پرووویروس، بیان سایر تولیدات ویروس را تنظیم می کند (۱۳). همچنین قادر به تحریک رونویسی از برخی ژنهای دیگر میزبان را که تحت کنترل مسیرهای signaling داخل سلولی (SRF: Serum Response Factor) و NFkB(Nuclear Factor kappa B) هستند می‌باشد. به نظر

می‌آید که عامل سرطانی شدن سلولهای T در اثر HTLV-I تحریک همین مسیرها است (۱۴، ۱۵، ۱۶). لذا به نظر می‌رسد اگر بتوان اثر تحریکی Tax بر رونویسی را از بین برد و در عین حال ایمنی‌زایی آن را حفظ نمود و آن را به نحوی به بدن فرد آلوده ارایه نمود که سیستم ایمنی سلولی را تحریک نماید، این پروتیین کاندیدای مناسبی برای یک واکسن درمانی خواهد بود.

برای بررسی فعالیت پروتیین Tax احتیاج به یک سیستم ریپورتر است که در آن یک ژن ریپورتر در پایین دست پروموترهای تحت کنترل Tax قرار گرفته باشند تا در صورت فعالیت Tax، بیان محصول این ژن به نحو قابل اندازه‌گیری تغییر یابد (۱۵، ۱۶، ۱۷). در مهمترین تحقیق در مورد اثر جهشهای مختلف بر فعالیت Tax که توسط Smith and Greene گزارش شده است از دو پلاسمید با پروموترهای HTLV-I LTR و HIV-I LTR، که به ترتیب تحت کنترل CREB و NFkB هستند، در بالادست ژن کلرامفنیکل استیل ترانسفراز (CAT) استفاده شده بود (۱۵). گروههای دیگری نیز از ریپورتر CAT به این منظور استفاده نموده‌اند(۱۶). در مقابل گروههای دیگری نیز از پلاسمیدهای ریپورتر مبتنی بر LacZ برای مطالعات مشابه استفاده نموده اند (۱۷، ۱۸). از ژن لوسیفراز نیز برای این منظور استفاده شده است (۱۹). برای بررسی مسیر CREB اکثرا از LTR خود ویروس به عنوان پروموتر استفاده شده است در حالی که برای مسیر NFkB از پروموترهای مختلفی نظیر HIV LTR، IL2، IL2 receptor استفاده شده است (۱۹-۱۵).

با توجه به در دسترس نبودن چنین پلاسمیدهایی برای پژوهشگران این پژوهش در ایران، هدف این تحقیق ساخت پلاسمیدهای ریپورتر برای بررسی میزان فعالیت موتانتهای ژن tax به منظور ساختن موتانت مناسب برای استفاده در یک DNA vaccine ضد HTLV I بوده است. به این منظور احتیاج به انتخاب پروموترهای مناسب برای دو مسیر سیگنالینگ CREB و NFkB، و استفاده از یک ژن ریپورتر بود. نتایج به دست آمده نشان از موفقیت در ساختن این دو پلاسمید و قابلیت ارزیابی نتایج به سه روش متفاوت کمی و کیفی بیان ژن ریپورتر دارد.

مواد و روشها

تکثیر قطعات ژنی مورد نیاز

الف: پروموتر تحت کنترل سیستم CREB/ATF: ناحیه 5'-LTR پرووروس HTLV-I دربرگیرنده پروموتر این ویروس است. در این ناحیه ۳ عنصر ژنی که ساختاری بسیار شبیه CRE(Cyclic AMP Response Elements) دارند شناسایی شده‌اند . بررسیهای بسیار نشان داده است که این ۳ قسمت مسئول بیشترین رونویسی از پرووروس HTLV-I تحت کنترل Tax هستند و از این رو آنها را TRE-I(Tax Response Elements) می‌نامند. بین TRE-I پروکزیمال و سانترال، عنصر قابل کنترل توسط Tax دیگری وجود دارد که در حالت طبیعی اثر قابل توجهی در تولید RNA ویروسی ندارد (TRE-II) (۱۳).

دو پرایمر که دارای سایت برای برش آنزیم *HinDIII* بوده برای قسمتی از HTLV-I LTR، طراحی گردید که برای داشتن حداکثر توان شامل هر ۳ توالی پاسخ به **TRE-I (Tax Response Element, TRE) Tax** و TATA Box بود (۵).

FLTR: ACTAAGCTTTTGAAGAATACACCAACATCCC و
RLTR: ACTAAGCTTGAACGCGCTCAACCGGCGTGGAT

این قسمت به طول تقریبی ۴۸۰جفت باز طی ۳۰ cycles (۹۴درجه، ۵۵درجه، ۷۲ درجه در یک ۴۵ ثانیه) ازروی پلاسمیدی که در آن HTLV1-LTR یکی از ناقلین ویروس کلون شده بود تکثیر شد.

ب: پروموتر تحت تاثیر سیستم NFkB: ژن زنجیره آلفای گیرنده اینترلوکین ۲ (IL2-Ra) یکی از ژنهای انسانی است که رونویسی از آن در لمفوسیتهای آلوده به HTLV-I و تحت تاثیر Tax افزایش می‌یابد(۲۰). پس از مشخص کردن ناحیه پروموتری این ژن بر اساس سکانس موجود در بانک ژن (Accession number: M15864) و به ویژه عنصر تحت کنترل NFkB بر اساس داده‌های بانک اطلاعاتی Transfac, (http://www.gene-reggulation.com/pub/databases.html#transfac) دو پرایمر به نحوی طراحی گردیدند که محصولPCRای به طول ۴۲۰جفت‌باز تولید گردد که شامل (IL2RF: ACTAAGCTTTGAGACCACTGCCAAGAAGT و IL2RR: ACTAAGCTTCAGTTGCCGTCAGCCTCTTT) این قطعه ژنی از روی Genomic DNA انسان سالم که با استفاده از کیت Whole Blood DNA extraction (Roche, Germany) استخراج گردیده بود، با شرایط PCR مانند قبل تکثیر گردید.

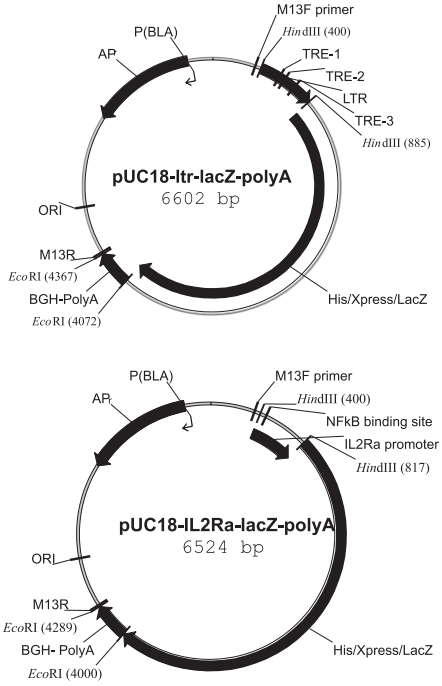
ج: در مرحله بعد Poly Adenylation signal ژن BGH(Bovine Growth Hormone) با پرایمرهای دارای سایت برش *Eco RI* از روی پلاسمید pCDNA3.1/His/LacZ (Invitrogen) به طول ۲۹۵جفت‌باز با پارامترهای قبلی و توسط دو پرایمر زیر تکثیر گردید.

POLARE: GATGAATTCCCGCATCCCAGC
POLAFE: AGCCGAATTCTGCAGATATCC

ساخت پلاسمیدها

ژن LacZ به طول تقریبی ۳۰۶۰جفت‌باز از پلاسمید pCDNA3.1/His/LacZ(Invitrogen) با برش آنزیمهای *HinDIII-Eco RI*(Roche) خارج و در وکتور pUC18 ساب کلون گردید. سپس قطعه LTR در سایت *HinDIII* پلاسمید pUC-LacZ کلون شد. غربالگری کلونهای دارای جهت صحیح LTR ابتدا به وسیله PCR با پرایمر M13 Forward و RLTR طی ۲۰ سیکل بر روی کلونهای باکتری انجام و سپس پلاسمیدهای حاصل با هضم آنزیمی تایید شد در مرحله آخر قطعه BGH PolyA signal در سایت *Eco RI* پلاسمد کلون گردید. کلونیها مانند مرحله قبل با PCR با پرایمرهای M13 reverse & FPOLA و سپس هضم

آنزیمی پلاسمیدها غربال شده و در نهایت پلاسمید کامل pUC-LTR-LacZ-PolyA در سلولهای *Ecoli Top10* تکثیر گردید (شکل ۱).



شکل۱: نقشه نهایی پلاسمیدهای ریپورتر با پروموترهای HTLV-I LTR و IL2Ra. محل برشهای آنزیمی مورد استفاده، قسمتهای مهم اشاره شده در متن مقاله و پرایمرهای M13Forward and Reverse نیز مشخص گردیده‌اند

در مرحله بعد پروموتر HTLV-I با پروموتر IL2Ra تعویض گردید تا pUC-IL2Ra-LacZ-PolyA به دست آید (شکل۱). پس از کامل شدن هردو پلاسمید ناحیه پروموتری آنها با استفاده از پرایمریونیورسال M13forward سکانس گردید و صحت این ناحیه و ابتدای ژن بتا گالاکتوزیداز تایید شد.

پلاسمید بیانی *tax* (pCDNA-tax) نیز با کلون نمودن tax cDNA ویروس HTLV-I در سایتهای *HinDIII- EcoRI* پلاسمید pCDNA3.1/HisLacZ ساخته شد و با سکانسینگ تایید گردید.

سلولها

سلولهای رده ۲۹۳T (۲۱) در محیط RPMI1640(Gibco) حاوی ۱۰درصد FBS و NaHCo34mM در ۳۷درجه سانتی‌گراد و ۵درصد CO_2 کشت داده شد.

ترانسفکشن

پلاسمیدهای ریپورتر تولید شده به تنهایی و همراه با پلاسمید بیانی Tax با استفاده از کیت Polyfect شرکت Qiagen در 6 well plate (Corning) به سلولهای ۲۹۳T انتقال یافتند. به منظور کنترل آزمایشات، سلولها با پلاسمید pCDNA3.1/His/LacZ و pCDNA-tax به تنهایی نیز (به عنوان کنترل مثبت و یک کنترل منفی) ترانسفکت شدند.

اندازه‌گیری میزان پروتیین

به منظور نرمالیزه کردن نتایج مربوط به اندازه گیریهای کمی بتاگالاکتوزیداز بر اساس میزان سلولهای موجود در هر نمونه، میزان پروتیین کل هر نمونه با روش Bradford (۲۲) و با مقایسه با منحنی استاندارد رسم شده بر اساس میزانهای مختلف BSA اندازه‌گیری گردید.

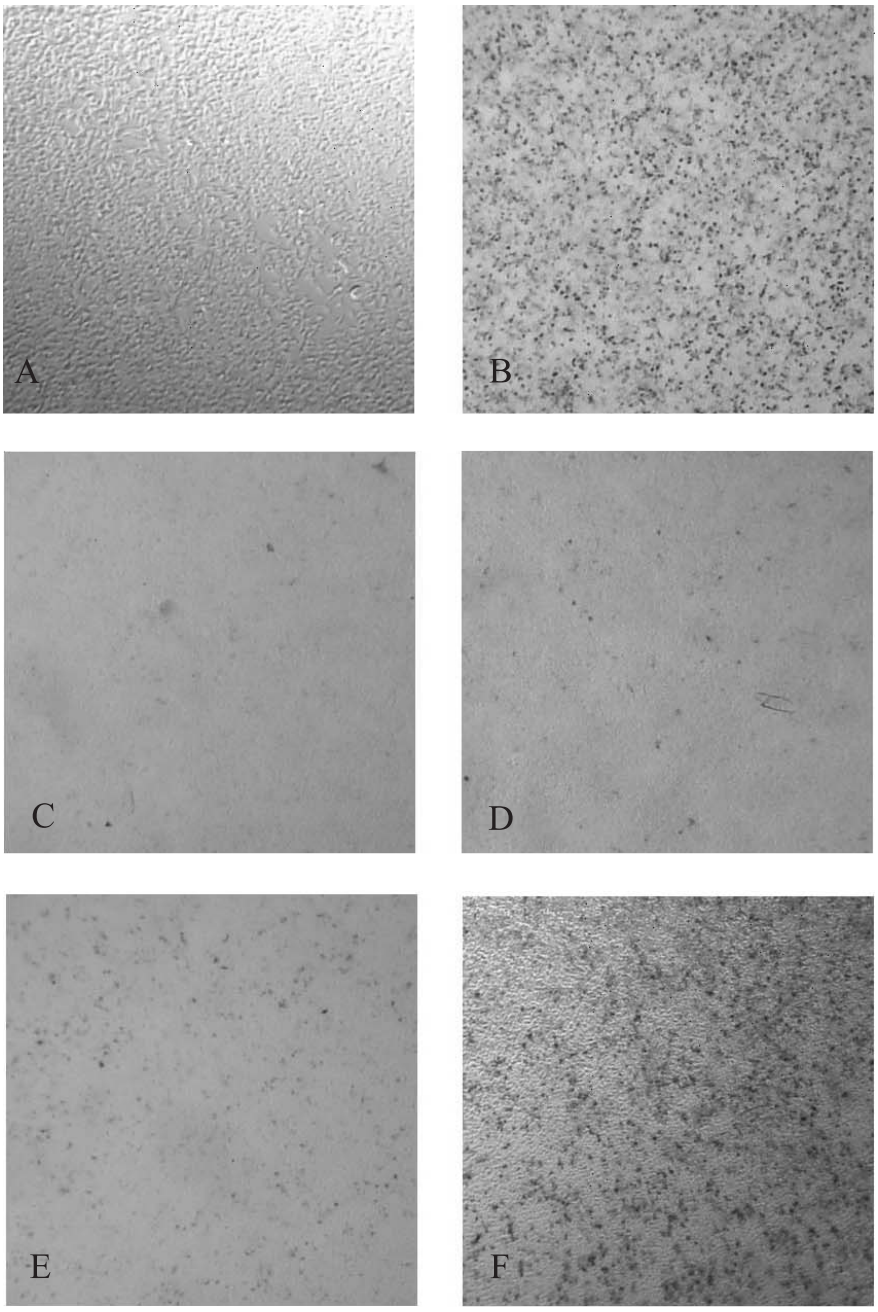
ارزیابی بیان beta galactosidase

(الف) بررسی کیفی: توسط یک کیت تهیه شده با اقتباس از beta gal staining Kit (Invitrogen) شامل فروسیانید پتاسیم (Fluka)400mM، فریسیانید پتاسیم (Fluka)400mM، کلرید منیزیم (Mreck)200mM و XgaL 20mg/ml(Fermentas)، به طور خلاصه مطابق روش زیر انجام گردید: ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، سلولها با گلوتارآلدید ۵درصد، به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شده، با ترکیب فروسیانید پتاسیم، فریسیانید پتاسیم، منیزیم کلراید (۱۰ میکرولیتر از هریک) و۲۵ میکرولیتر X-Gal به ازای هر خانه یک پلیت ۶ خانه کشت سلول، رنگ‌آمیزی شده و پس از ۲ ساعت انکوبه کردن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زیر میکروسکوپ اینورت (Zeiss) بررسی شد و به وسیلهٔ دوربین دیجیتال SONY DSC-P72 از طریق عدسی چشمی میکروسکوپ عکسبرداری گردید.

(ب) بررسی کمی با روش الایزا: با استفاده از کیت beta-Gal ELISA(Roche) و مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط سازنده، ابتدا عصاره پروتیینی هر یک از نمونه‌های مورد بررسی با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر lysis buffer 1x تهیه گردید، پس از سانتریفوژ به منظور جداسازی باقی‌مانده‌های سلولی، مایع رویی به یک میکروتیوب جدید انتقال یافته و در ۷۰-درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش ذخیره گردید. از هر نمونه غلظتهای ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ در تست الایزا مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به میزان بالای بیان در مطالعات مربوط به پلاسمید pUC-LTR-Lacz-PolyA ، رقت ۰/۰۰۱ این نمونه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای رسم نمودار استاندارد نیز غلظتهای ارایه شده در کیت به صورت دوتایی بررسی شدند.

(ج) ارزیابی کمی به روش ارزیابی فعالیت بتاگالاکتوزیداز: به منظور افزایش حساسیت تست و نیز قابل انجام شدن در microtiter plate و استفاده از Microtiter plate reader، با تغییر در پروتکل ارایه شده توسط Sambrook and Russel (۲۳) پروتکل تازه‌ای به شرح زیر تهیه گردد: ۲۴۵میکرولیتر Sodium Phosphate buffer، ۳میکرولیتر $2ME\text{-}MgCl_2$ 100x buffer و 20ul CPRG (4mg/ml; Roche) به ازای هر

نمونه در میکروپلیت ۹۶ خانه مخلوط گردیده سپس ۳۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده با روش بالا و با رقت مورد نظر(بین ۱ تا ۰/۰۰۱) به آن اضافه گردید. پلیتها در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند و در زمانهای ۱۰، ۲۵ و ۴۰ دقیقه توسط میکروپلیت ریدر MR700(Dynatech, USA) در طول موج ۵۵۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل با محاسبه میانگین تفاوت جذبهای نوری هر نمونه در فواصل ۱۵ دقیقه‌ای و تقسیم آن بر ۱۵، به یک واحد اختیاری Mean OD change/minute تبدیل گردیدند. به منظور استاندارد کردن این نتایج بر اساس میزان سلول موجود در هر نمونه، با ضرب شدن در نسبت پروتیین موجود در نمونه بر پروتیین موجود در نمونه کنترل منفی (ترانسفکت نشده) نتایج نهایی به دست آمد.



شکل۲: سلولهای T۲۹۳ پس از ترانسفکشن با پلاسمیدهای مختلف و رنگ‌آمیزی با X-gal پس از ۲ ساعت (۴۰x)، a: بدون ترانسفکشن ، b: با c.pCDNA/HisLacZ : ریپورتر NFkB به تنهایی، d: ریپورتر NFkB و pCDNA-tax، e: ریپورتر CREB به تنهایی، f: ریپورتر CERB و pCDNA-tax

تصویر رنگی در انتهای مقالات

آنالیز آماری

نتایج رنگ‌آمیزی و ارزیابی کیفی به صورت «درصد سلولهای رنگ شده در شمارش ۲۰۰ سلول در بزرگنمایی ۲۰۰» ارائه می گردند. مقایسه نتایج دو روش کمی با یکدیگر با بررسی ضریب همبستگی و نمودار پراکندگی و با استفاده از نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. نتایج ۴ سری آزمایش مستقل در آنالیز اخیر مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

ارزیابی کیفی اثر پلاسمید بیانی Tax بر بیان آنزیم بتاگالاکتوزیداز تحت کنترل سیستمهای سیگنالینگ CREB و NFkB

با وجود بیان زمینه‌ای نسبتا بالای آنزیم بتاگالاکتوزیداز تحت کنترل پروموتر HTLV-I، تفاوت تعداد و شدت رنگ سلولهای بیان کننده در ترانسفکشن همزمان این پلاسمید ریپورتر و پلاسمید بیانی Tax کاملا مشهود بود. به علت زمان نسبتا طولانی مورد نیاز برای اطمینان از بیان هر دو پروتیین Tax و بتاگالاکتوزیداز (دو روز)، سلولها تقریبا تمام سطح پلیت را می‌پوشانند که این امر تخمین دقیق درصد سلولهای بیان کننده را دچار اشکال می‌سازد. با این وجود شمارش ۲۰۰ سلول در بزرگنمایی ۲۰۰، درصد سلولهای بیان کننده در نمونه حاوی pCDNA-tax و pUC-LTR-LacZ-PolyA را در حدود ۲۰درصد نشان می‌دهد در صورتی که این نسبت در نمونه‌های حاوی پلاسمید ریپورتر به تنهایی ۸درصد را نشان می‌داد. سلولهایی که فقط با pCDNA-tax ترانسفکت شده بودند هیچ تغییر رنگی را نشان نمی‌دادند. تفاوت بین این سری نمونه‌ها حتی با چشم غیر مسلح نیز آشکار بود (شکل ۲ قسمتهای e و f).

میزان سلولهای تغییر رنگ یافته در نمونه‌های حاوی pUC-IL2Ra-LacZ-PolyA با یا بدون pCDNA-tax بسیار کمتر از میزانهای مشاهده شده در مورد پروموتر HTLV-I بودند. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها این نسبتها به طور متوسط در حدود ۵ و۲درصد در نمونه‌های حاوی Tax و فاقد آن بودند (شکل۲، قسمتهای b و c).

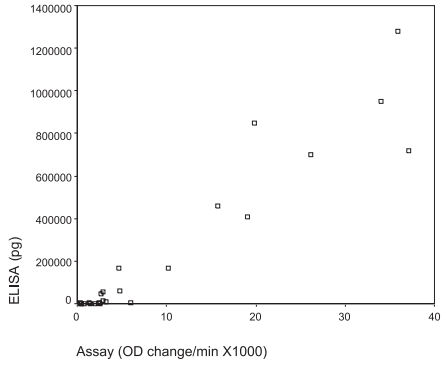
ارزیابیهای کمی

مقادیر محتلف به دست آمده برای هر نمونه در تستهای الایزا و فعالیت سنجی (پس از تصحیح بر اساس میزان پروتیین کل هر نمونه) در جدول ۱ آمده است.

این نتایج نشان دهنده افزایشی حدود ۱۰ برابردر بیان بتا گالاکتوزیداز تحت کنترل پروموتر HTLV-I و ۳/۵ برابر در پروموترIL2Ra در اثر Tax است. نتایج الایزا و فعالیت سنجی در جدول ۱ آمده است. شکل ۳ نیز نشان دهنده میزان همبستگی نتایج حاصل از این دو روش می‌باشد. ضریب همبستگی این دو روش مقدار r=۰/۹۴۹ (P=۰/۰۰۰) به دست آمد.

جدول ۱: نتایج مطلق و نسبی تستهای الایزا و فعالیت سنجی بتاگالاکتوزیداز در نمونه‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدهای مختلف پس از دو روز از ترانسفکشن

پلاسمید	فعالیت (تغییر OD در دقیقه)	فعالیت نسبی	الایزا (pg)	الایزا (نسبی)
PCDNA/tax+LTR	۲/۹۶	۹/۲۵	۵۴۰۰۰	۱۰/۳۸
LTR	۰/۳۲	۱	۵۲۰۰	۱
PCDNA/tax+IL2Ra	۰/۸۱	۳/۶۸	۵۶۰	۳/۱۴
IL2Ra	۰/۲۲	۱	۱۷۶۰	۱



شکل۳: نمودار پراکندگی بین نتایج الایزا و فعالیت سنجی بتا گالاکتوزیداز

بحث

از بین ژنهای پروتیینهای مختلفی که برای ساخت سیستمهای ریپورتر به کار می‌روند (نظیر *LacZ*، *Luc*، *GUS GFP*، *CAT*) (۱۵؛ ۲۴-۲۶) به دلیل مزیتهای سیستم LacZ، شامل امکان ارزیابی آن هم به صورت کیفی، هم کمی، امکان استفاده آن در سیستمهای زنده و عدم نیاز به دستگاههای گران قیمت برای ارزیابی، این سیستم انتخاب گشت. ژن *LacZ* آنزیم بتاگالاکتوزیداز باکتریایی را کد می کند که تولید آن روشهای مختلف مانند رنگ‌آمیزی، رنگ‌سنجی، فلورومتری و ELISA قابل ارزیابی است (۲۴).

از بین سه روش ارزیابی بتاگالاکتوزیداز که در این گزارش مورد بررسی قرار گرفتند، روش رنگ‌آمیزی به عنوان یک روش اولیه و کیفی مورد استفاده قرار گرفت. این روش از مزیتهای سادگی، سرعت (معمولا حدود ۲ ساعت) و ارزانی مواد اولیه برخوردار است. در مقابل این روش حساسیت کمتری در مقادیر پایین ترانسفکشن و یا کمی بیان داخل هر سلول دارد. در رنگ‌آمیزیهای ما پلاسمید بیانیTax به تنهایی هیچ تغییر رنگی در سلولهای T ۲۹۳ ایجاد نکرد. اما تعداد کمی از این رده سلولی در حضور پلاسمید ریپورترCREB به تنهایی به رنگ آبی درآمدند که نشان‌دهنده بیان زمینه‌ای beta gal است. با وجود این که یکی از ضعفهای beta gal وجود مقدار ناچیزی از این آنزیم در سلولهای یوکاریوتیک است اما در این رده سلولی هیچ تغییر رنگی در سلولهای ترانسفکت نشده مشاهده نشد. با این حال در co transfection پلاسمیدهای بیانی Tax و پلاسمید ریپورتر pUC-LTR-LacZ-PolyA افزایش بسیار قابل توجهی هم در شدت

تغییر رنگ و هم در تعداد سلولهای آبی نشان داد (شکل ۲). با وجود بیان بسیار کمتر پلاسمید pUC-IL2Ra-LacZ-PolyA، تفاوت بیان آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور و عدم حضور پلاسمید حاوی Tax در این نمونه‌ها نیز قابل تمایز است. به علت عدم امکان تمایز دقیق چشمی بین میزان بیان بتاگالاکتوزیداز در سلولهای مختلف، در این روش تنها تعداد سلولهای رنگ شده قابل مقایسه است و میزان کل بیان قابل اندازه‌گیری نیست. برای بهبود کنتراست رنگ‌آمیزی در این روش اضافه کردن مواد رنگی دیگری چون سافرانین، که باعث سرخ شدن پس زمینه می‌گردد، نیز پیشنهاد شده است (۲۷).

روش فعالیت سنجی که توسط Sambrook & Russel (۲۳) ارایه گردیده مبتنی بر توقف فعالیت رنگ زا و سپس مقایسه تغییر رنگ نهایی نمونه است. در این روش زمان توقف واکنش اهمیت زیادی می‌یابد، چرا که سرعت تغییر رنگ در نمونه‌های دارای بتا گالاکتوزیداز بیشتر، بیشتر است. به علاوه حجم کل واکنش در پروتکل Sambrook & Russel حدود یک میلی‌لیتر است که امکان استفاده از میکروپلیت برای افزایش سرعت و بهره‌وری را منتفی می‌سازد. کم کردن حجم اجزا واکنش نیز منجر به افزایش خطای پیپتینگ در این روش خواهد شد. در مقابل روشی که ما مورد استفاده قرار داده‌ایم مبتنی بر اندازه‌گیری سرعت مصرف سوبسترا است (۲۸). به طور خلاصه، V_{max} آنزیم در نمونه‌های مختلف در شرایط یکسان تابعی از میزان آنزیم موجود در هر نمونه است. با توجه به در دسترس نبودن دستگاهی که بتواند کینتیک تغییر رنگ (مصرف سوبسترا) را در دمای ثابت (۳۷ درجه سانتی‌گراد) در فواصل زمانی کوتاه بررسی نمایید، ما با افزایش بسیار زیاد میزان سوبسترا در واقع آنزیم را اشباع نمودیم تا رابطه زمان- مصرف سوبسترا خطی گردد. به این ترتیب اندازه‌گیری میزان تغییر رنگ در فواصل زمانی طولانی‌تر ثابت و برابر V_{max} باقی می‌ماند و در این مدت امکان انکوبه کردن پلیتها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نیز فراهم می‌آید. در صورت موجود بودن میکروپلیت ریدری که بتواند همزمان با انکوبه کردن پلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در فواصل کوتاه زمانی (مانند ۱ دقیقه) شدت رنگ را اندازه‌گیری نماید می‌توان میزان سوبسترای استفاده شده در پروتکل ارایه شده در این گزارش را دهها برابر کاهش داد و تنها با اندازه‌گیری V_{max} و در زمان کوتاه‌تری نمونه‌ها را مقایسه کرد (۲۹).

روش الایزا به خاطر اختصاصی بودن برای بتاگالاکتوزیداز با منشا پروکاریوتی (مانند محصول پلاسمیدهای معرفی شده در این گزارش)، قادر به شناسایی مقادیر ناچیزی از بتاگالاکتوزیداز تولیدی در سلولهای یوکاریوتی نیست و در نتیجه ویژگی بالاتری دارد. در حالی که آنزیمهای با منشا یوکاریوتی و پروکاریوتی هردو قادر به کاتالیز واکنشهای رنگ‌زا هستند و تستهای ارزیابی فعالیت قادر به تمایز این دو نیستند. با این وجود با توجه به همبستگی بسیار بالای نتایج این دو روش در این تحقیق، سایر پارامترها در ترجیح دادن یکی از این دو روش اهمیت بیشتری می‌یابد. قیمت کیتهای الایزا که برای تعداد محدودی تست (در تجربه ما ۱۹۲ تست) قابل استقاده است، بسیار گران‌تر از تهیه سوبسترای بسیار حساسی چون CPRG است. در حال حاضر کیتهای آماده‌ای که عمدتا از سوبسترای ONPG استفاده می‌کنند در بازار وجود دارند(مانند کیت شرکت Invitrogen) اما تجربیات نه چندان موفق قبلی ما با این سوبسترا و حساسیت بیشتر CPRG (۲۳، ۲۹) ما را بر آن واداشت که روش مبتنی بر سوبسترای اخیر را در آزمایشگاه خود راه‌اندازی نماییم. زمان مورد نیاز برای این روش در حدود ۱/۵ساعت است در حالی که برای الایزا این زمان در حدود ۴ ساعت است. بهترین طول موج قابل استفاده برای بررسی تغییر رنگ CPRG، ۵۷۰ نانومتر است که طول موج رایجی برای فیلترهای دستگاههای microplate reader نیست، اما با توجه به طیف جذبی این ماده رنگی، این ارزیابی با حساسیتی کمتر در طول موجهای ۵۵۰ تا ۵۹۰ نانومتر نیز ممکن است (نتایج نشان داده نشده).

به علت تغییرات میزان موفقیت ترانسفکشن در شرایط مختلف (به ویژه تفاوت در confluency به هنگام ترانسفکشن)، بهترین روش برای حذف این تغییرات استفاده همزمان از یک پلاسمید ریپورتر دیگر است که کدکننده پروتیینی غیرمرتبط تحت یک پروموتر غیر قابل تنظیم باشد، (مانند ژنهای هورمون رشد GH وکلرامفنیکل استیل ترنسفراز CAT، تحت کنترل پروموتر CMV). با تقسیم نتایج خام فعالیت یا مقدار بتاگالاکتوزیداز بر بیان این پروتیین دوم در هر نمونه، میزان اثر پروموترهای مختلف در میزانهای ترانسفکشن مختلف به خوبی نرمالیزه می‌شود(۲۳). در این گزارش به دلیل در دسترس نبودن چنین پلاسمیدی، اولا تمام گروههای مورد بررسی در سریهای همزمان ، با confluencyهای مشابه، ترانسفکت شدند، ثانیا نتایج هر نمونه برای میزان پروتیین توتال (به عنوان شاخص میزان سلول نهایی و به طور غیر مستقیم confluency به هنگام ترانسفکشن) نرمالیزه شدند.

گرچه وجود بیان زمینه‌ای پروتیین ریپورتر یک نقطه ضعف برای چنین سیستمهایی به شمار می‌رود (۳۰)، تفاوت قابل ملاحظه بیان در حضور و غیاب ژن tax، هردو سیستم ساخته شده را کاملا قابل قبول می‌سازد. به نظر می‌رسد وجود هر سه TRE در پلاسمید ریپورتر pUC-LTR-LacZ-PolyA باعث بالا رفتن رونویسی از LacZ توسط پروتیینهای CREB سلولی شده باشد، لذا در صورت نیاز به کنترل دقیق‌تر بیان ژن *LacZ* احتمالا می‌توان یکی از TREها را حذف نمود (۱۳). بیان زمینه‌ای در pUC-IL2Ra-LacZ-PolyA نیز دیده می‌شود که با توجه به منشا انسانی داشتن این پروموتر غیر قابل اجتناب به نظر می‌رسد.

نتایج مربوط به دو پروموتر غیر مرتبط استفاده شده در این پژوهش شاهدی است بر این که با جایگزینی پروموترهای دیگری در جایگاههای *HinDIII* از پلاسمیدهای معرفی شده می‌توان به آسانی ریپورترهایی برای سایر عناصر Trans- acting داخل سلولی ساخت. مزیت دیگر پلاسمیدهای ساخته شده در این پژوهش وجود اپیتوپهای xHis ۶ و Xpress در انتهای آمینی بتاگالاکتوزیداز تولید شده است. برای مثال می‌توان به جای استفاده از کیتهای الایزای گران قیمت موجود در بازار، با استفاده از هر زوج از آنتی‌بادیهای

Anti His, Anti beta-gal و Anti Xpress که به صورت تجاری نیز موجود هستند سیستم الایزای ساندویچی برای اندازه گیری آن طراحی نمود. یا می‌توان از هر یک از آنتی‌بادیهای فوق (به ویژه Anti His که در بسیاری آزمایشگاهها در دسترس می‌باشد) برای بررسی مستقیم سلولهای بیان کننده به وسیله ایمونوفلورسانس و یا فلوسایتومتری استفاده کرد. استفاده از فلوسایتومتری امکان بررسی همزمان میزان تحریک پروموتر بالادست ژن بتاگالاکتوزیداز با سایر پارامترهای احتمالی مورد نظر (نظیر اندازه سلول، وضعیت سیکل سلولی، بیان سایر مارکرها یا پروتیینها و غیره) را نیز فراهم می‌سازد (۳۱). استفاده از این پلاسمیدها در یافتن ترانسکریپشن فاکتورهای جدید یا بررسی اثرات داروهای جدید نیز از پتانسیلهای دیگر این سیستم است. به این منظور کافی است ژن پروتیین مورد نظر را در وکتور بیانی مناسب کلون نمود و پلاسمید به دست آمده را همراه با پلاسمید ریپورتر وارد سلول نمود (۳۲). یا سلولهای یوکاریوتی را با پلاسمید ریپورتری، که تحت کنترل پروموتر یا Enhancer خاصی است،ترانسفکت نمود و سپس داروی مورد نظر را به محیط کشت اضافه کرد و اثرات آن را بررسی نمود (۳۳).

به طور خلاصه، در این مقاله مراحل طراحی، ساخت و روشهای ارزیابی فعالیت پلاسمیدهای ریپورتر مبتنی بر ژن بتا گالاکتوزیداز و مثالهای کاربردی آن در بررسی فعالیت یک پروتیین ترانس اکتیویتور ویروسی ارائه شده است. روشها و پلاسمیدهای ارایه شده در این گزارش ابزارهای مناسبی برای مطالعات بیولوژی مولکولی به ویژه در باره سرطانها و ویروسها در اختیار پژوهشگران قرار می‌دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله لازم می‌دانند از آقای دکتر محمدعلی شکرگزار و دکتر امیر امان‌زاده در بانک سلولی ایران به خاطر در اختیار قرار دادن رده سلولی و محیطهای کشت مورد استفاده در این پژوهش، همچنین از خانم دکتر لادن تیموری به خاطر همکاری در ساخت یکی از پلاسمیدهای ریپورتر و کمک در ویرایش مقاله سپاسگزاری کنند. از آقای سعید عندلیبی نیز که مارا در تهیه و تنظیم مقالات یاری نمودند سپاسگزاریم.

References

1. Bivona TG, Philips MR: Ras pathway signaling on endomembranes. Curr Opin Cell Biol 2003; 15(2): 136-142

2. Sawhney RS, Cookson MM, Sharma B, Hauser J, Brattain MG: Autocrine transforming growth factor alpha regulates cell adhesion by multiple signaling via specific phosphorylation sites of p70S6 kinase in colon cancer cells. J Biol Chem 2004; 5: (279) 4590-47379

3. Snider WD, Zhou FQ, Zhong J, Markus A: Signaling the pathway to regeneration. Neuron 2002 Jul 3; 35(1): 13-16

4. Kikuchi A: Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. Cancer Sci 2003; 94(3): 225-229

5. Helt AM, Galloway DA: Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. Carcinogenesis 2003; 24(2): 159-169

6. Helt AM, Funk JO, Galloway DA: Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. J Virol 2002; 76(20): 10559-10568

7. Hassan M, Ghozlan H, bdel-Kader O: Activation of RB/E2F signaling pathway is required for the modulation of hepatitis C virus core protein-induced cell growth in liver and non-liver cells. Cell Signal 2004; 16(12): 1375-1385

8. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, Sanij E, Hertzog P, Wolvetang E, Ghysdael J, Rowe M, Hara E: Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. J Cell Biol 2003; 162(2): 173-183

9. Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, Ahkami R, Franchini G: Prevalence of HTLV type I infection in Iran: a serological and genetic study. AIDS Res Hum Retroviruses 1996; 2(12): 1185-1190

10. Gessain A, Mahieux R: [Epidemiology, origin and genetic diversity of HTLV-1 retrovirus and STLV-1 simian affiliated retrovirus]. Bull Soc Pathol Exot 2000; 93(3): 163-171

11. Safai B, Huang JL, Boeri E, Farid R, Raafat J, Schutzer P, Ahkami R, Franchini G: Prevalence of HTLV type I infection in Iran: a serological and genetic study. J Virol 1999; 73(12): 10289-10295

12. Azadmanesh K, Roohvand F, Amini S, Kazanji M: Detection, Cloning, Molecular Characterization and Phylogenic Analyses of a New Primate T-Cell Lymphotropic Virus Type I in Olive Baboon. J Iranian of Biotechnology 2004

13. Goren I, Tavor E, Honigman A: Gene regulation mediated by interaction between HTLV-1 promoter elements and transcription factors Tax and CREB. Virology 1999; 256(2): 303-312

14. Akagi T, Ono H, Nyunoya H, Shimotohno K: Characterization of peripheral blood T-lymphocytes transduced with HTLV-I Tax mutants with different trans-activating phenotypes. Oncogene 1997; 14(17): 2071-2078

15. Smith MR, Greene WC: Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. Genes Dev 1990; 4(11): 1875-1885

16. Matsumoto K, Shibata H, Fujisawa JI, Inoue H, Hakura A: Tsukahara T, Fujii M: Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways

17. Copeland KF, Haaksma AG, Derse D, Goudsmit J, Heeney JL: Cytochemical analysis of human T cell leukaemia virus I LTR-regulated beta-galactosidase gene expression using a novel integrated cell system. J Virol Methods 1993; 45(2): 161-167

18. Astier-Gin T, Portail JP, Lafond F, Guillemain B: Identification of HTLV-I- or HTLV-II-producing cells by cocultivation with BHK-21 cells stably transfected with a LTR-lacZ gene construct. J Virol Methods 1995; 51(1): 19-29

19. Okada M, Jeang KT: Differential requirements for activation of integrated and transiently transfected human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. J Virol 2002; 76(24): 12564-12573

20. Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B: Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. Virology 2003; 308(1): 1-12

21. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D: Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(18): 8392-3296

22. Ausubel FM: BRKRMDSJ. Short Protocols in Molecular Biology. New York: John Wiley, 1999

23. Sambrook JJ, Russel D: Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001

24. Naylor LH: Reporter gene technology: the future looks bright. Biochem Pharmacol 1999; 58(5): 749-757.

25. Tavare JM, Fletcher LM, Welsh GI: Using green fluorescent protein to study intracellular signalling. J Endocrinol 2001; 170(2): 297-306

26. Basu C, Kausch AP, Chandlee JM: Use of beta-glucuronidase reporter gene for gene expression analysis in turfgrasses. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320(1): 7-10

27. Ho KC, Lin PS: Safranin O counter-staining enhances the counting of beta-galactosidase-expressing cells. Biotechniques 1997; 23(4): 642

28. Nelson DL, Cox MM: Lehninger Principles of biocehmistry. New York: Worth publishers; 2000

29. Eustice DC: FPC-PABRNRH. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. Biotechniques 1999; 11(6): 739-743

30. Sourisseau T, Le DY, Salbert G, Flamant F, Michel D: Eukaryotic conditional expression system. Biotechniques 1999; 27(1): 106-110

31. Karttunen J, Shastri N: Measurement of ligand-induced activation in single viable T cells using the lacZ reporter gene. Proc Natl Acad Sci USA 1991;v 88(9): 3972-3976

32. Grimm S: The art and design of genetic screens: mammalian culture cells. Nat Rev Genet 2004 Mar; 5(3): 179-189

33. Plant N: Strategies for using in vitro screens in drug metabolism. Drug Discov Today 2004; 9(7): 328-336