Original Article

Screening Phage Display Library for Isolation of Human Colon Cancer Cell-binding Peptide Ligands

Babak Bakhshinejad[1], Mohammad Khalaj-Kondori[2], Saeedeh Ghiasvand[1], Majid Sadeghizadeh[3*]

1- PhD. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran
3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

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

Received: 08/Jun/2014, Accepted: 15/Jul/2014

Abstract

Objective: Recently, phage display libraries have received enormous attention for identification and isolation of pharmaceutical molecules with diagnostic and therapeutic properties. Peptide libraries are known as one of the most important and widely used types of phage display libraries. In the current study, we aimed to screen the Ph.D.™-7 phage display peptide library through biopanning for the identification of human colon adenocarcinoma-binding peptide ligands.

Methods: Three rounds of biopanning were performed on SW480 as the target cell and fibroblast (HF-SF-PI3), AGS, KYSE-30 and Huh-7 as control cells. The displayed peptide-encoding regions in the genome of SW480-binding phages obtained from the final round of panning were amplified by plaque-PCR and subsequently sequenced. Bioinformatic tools were used to determine the sequence of target cell-binding peptides and further characterization of these peptides.

Results: Biopanning of the phage library led to the enrichment of several peptides among which the peptide with sequence "HAMRAQP" was the most dominant. Bioinformatic analysis of the isolated peptides indicated that they are not target unrelated peptides (TUP).

Conclusion: The peptides, in particular those with the highest frequency, due to having the capability of specific binding to SW480 cells represent the potential for use in targeting of therapeutic genes and drugs to colon cancer cells.

Keywords: Phage display, Phage library, Biopanning, Peptide, Colon cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 25-39

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

مقاله اصیل

غربالگری کتابخانه نمایش فاژی برای شناسایی لیگاندهای پپتیدی متصل شونده به سلول‌های سرطانی روده انسان

بابک بخشی‌نژاد[1]، محمد خلج کندری[2]، سعیده قیاسوند[1]، مجید صادقی‌زاده[3]*

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۴

چکیده

هدف: در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به کتابخانه‌های نمایش فاژی به‌عنوان ابزارهایی برای شناسایی و جداسازی مولکول‌های دارویی (با خواص تشخیصی و درمانی) شده‌است. کتابخانه‌های پپتیدی یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین انواع کتابخانه‌های نمایش فاژی هستند. هدف از انجام پژوهش حاضر غربالگری کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی Ph.D.™-7 از طریق فرآیند بیوپنینگ برای شناسایی لیگاندهای پپتیدی متصل شونده به سلول‌های SW480 (آدنوکارسینومای روده انسانی) بود.

مواد و روش‌ها: سه دور بیوپنینگ روی سلول SW480 به‌عنوان سلول هدف و سلول‌های فیبروبلاست طبیعی انسانی، آدنوکارسینومای معده انسانی، کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری انسانی و کارسینومای کبد انسانی به‌عنوان سلول‌های شاهد انجام شد. سپس با انجام plaque-PCR روی پلاک‌های به‌دست آمده از دور آخر بیوپنینگ قسمتی از ژنوم فاژهای متصل شونده به سلول SW480 که کد کننده پپتید نمایش یافته است، تکثیر و در گام بعد DNA تکثیرشده تعیین توالی شد. از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی برای شناسایی توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول هدف و نیز بررسی برخی ویژگی‌های توالی‌های مزبور استفاده شد.

نتایج: بیوپنینگ کتابخانه فاژی منجر به غنی‌سازی تعدادی پپتید شد که از بین آن‌ها توالی پپتیدی **HAMRAQP** دارای بیشترین فراوانی بود. بررسی بیوانفورماتیکی توالی‌های به‌دست آمده نشان داد که هیچ یک از آن‌ها جزء توالی‌های غیرمرتبط با هدف نیستند.

نتیجه‌گیری: از پپتیدهای شناسایی شده، به ویژه توالی‌های پپتیدی با فراوانی بالا، به علت برخورداری از قابلیت اتصال اختصاصی به سلول SW480 می‌توان برای هدایت هدفمند ژن و دارو به سلول‌های بدخیم روده استفاده نمود.

کلیدواژگان: نمایش فاژی، کتابخانه فاژی، بیوپنینگ، پپتید، سرطان روده

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۲۵-۳۹

مقدمه

روش نمایش فاژی (Phage Display) اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط اسمیت (Smith) معرفی شد [۱]. در این روش، DNA کد کننده یک (پلی) پپتید خارجی در داخل ژن کد کننده یکی از پروتئین‌های پوششی فاژ همسانه‌سازی می‌شود. این امر موجب می‌شود در سطح ویریون‌های فاژی بالغ، (پلی) پپتید مورد نظر به‌صورت فیوژن با پروتئین پوششی فاژی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

نمایش یابد؛ در حالی که DNA کد کننده این (پلی) پپتید در داخل ژنوم فاژ قرار دارد. بنابراین یک اتصال فیزیکی بین فنوتیپ و ژنوتیپ (Phenotype-Genotype Linkage) به‌وجود می‌آید که یکی از شاخصه‌های بسیار مهم و کاربردی روش نمایش فاژی است [۲]. تلفیق این روش با مفهوم فن‌آوری ترکیبی (Combinatorial Technology) موجب ظهور کتابخانه‌های نمایش فاژی (Phage Display Libraries) شده است. این کتابخانه‌ها ابزارهایی برای غربالگری با توان عملیاتی بالا (High Throughput Screening) به‌منظور شناسایی مولکول‌های دارویی محسوب می‌شوند [۳]. کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی (Phage Display Peptide Library) یکی از متداول‌ترین و پرکاربردترین انواع کتابخانه‌های نمایش فاژی است که در آن‌ها تعداد بسیار زیادی (چندین میلیارد) پپتید با توالی‌های تصادفی روی سطح فاژهای موجود در کتابخانه نمایش می‌یابد. در این کتابخانه‌ها، هر همسانه فاژی بیان کننده یک توالی اسید آمینه‌ای منحصر به فرد و جداگانه روی سطح خود است؛ اما در مجموع تمامی همسانه‌های فاژی موجود در کتابخانه در بر گیرنده میلیاردها پپتید نمایش یافته مختلف است که می‌توانند به‌عنوان منبعی غنی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای دارویی (تشخیصی و درمانی) (Peptide Diagnostics And Therapeutics) استفاده شوند [٤، ٥]. غربالگری کتابخانه‌های فاژی پپتیدی برای جداسازی پپتیدهای دارویی طی فرآیندی به نام بیوپنینگ (Biopanning) صورت می‌گیرد. بیوپنینگ که بر مفهوم انتخاب از طریق میل ترکیبی (Affinity Selection) استوار است، شامل چندین دور اتصال فاژ به عامل هدف، شستشو، جداسازی فاژ از عامل هدف و تکثیر فاژهای بازیابی شده است [٦، ٧]. بیوپنینگ می‌تواند به‌صورت *In vitro* (درون شیشه)، *In vivo* (درون‌تنی) و *Ex vivo* (برون‌تنی) و روی طیف وسیعی از ساختارهای هدف مانند پروتئین‌های تخلیص شده، آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، سلول‌های کشت داده شده، بافت‌ها و اندام‌های داخل بدن موجودات زنده انجام شود. یکی از مهم‌ترین و جالب‌ترین کاربردهای کتابخانه‌های پپتیدی فاژی، غربالگری آن‌ها روی سلول‌های سرطانی است؛ فرآیندی که در نهایت منجر به جداسازی پپتیدهایی با اختصاصیت و میل ترکیبی بالا برای اتصال به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های سرطانی (Cancer-Specific Peptides) می‌شود [۸، ۹].

سرطان روده یا کولون (Colon or Colorectal Cancer) سومین سرطان شایع در دنیا است. در حال حاضر جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی به‌عنوان روش‌های اصلی درمان این سرطان محسوب می‌شوند [۱۰-۱۲]. یکی از مشکلات بسیار مهم و جدی بسیاری از داروهای مورد استفاده برای شیمی‌درمانی، هدفمند نبودن و در نتیجه عدم اختصاصیت آن‌ها است. یافتن شیوه‌هایی برای هدفمندسازی درمان سرطان روده موجب افزایش کارآمدی روش‌های درمانی و برطرف شدن بسیاری از عوارض و مشکلات جانبی (Adverse Effects) ناشی از عملکرد غیراختصاصی داروهای شیمی درمانی می‌شود [۱۳، ١٤]. پپتیدها به علت اندازه کوچک، قابلیت بالا برای نفوذ به بافت‌ها به ویژه تومورهای سفت (Solid Tumors)، ایمنی‌زایی بسیار پایین و سهولت انجام انواع تغییرات شیمیایی برای افزایش پایداری، واجد ویژگی‌های فارماکوکینتیکی مطلوبی هستند [۱۵، ١٦]. بر همین اساس پپتیدهای متصل شونده به سلول‌های سرطانی روده (Colon-Binding Peptides) از قابلیت بالایی برای استفاده در تشخیص و درمان هدفمند بدخیمی‌های روده برخوردار هستند. اتصال پپتیدهای مزبور به انواع داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی یا ناقل‌های مورد استفاده برای رسانش داروهای ضد سرطان، موجب افزایش قابل ملاحظه اختصاصیت رسانش دارو به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی روده می‌شود. این امر امکان استفاده از دوزهای کمتر دارو را فراهم می‌آورد که خود عامل بسیار مهم و تعیین کننده‌ای برای کاهش سمیت داروهای شیمی درمانی است.

هدف از مطالعه حاضر غربالگری کتابخانه نمایش فاژی هفت اسید آمینه‌ای موسوم به Ph.D.^{TM}-7 از طریق روش بیوپنینگ برای جداسازی پپتیدهای متصل شونده به سلول‌های SW480 (رده سلولی آدنوکارسینومای روده انسانی) بود. انجام

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

بیوپنینگ موجب جداسازی فاژهای واجد پپتیدهای متصل شونده به سلول‌های آدنوکارسینومای روده شد. پس از انجام PCR برای تکثیر قسمتی از ژنوم فاژ، قطعات DNA حاصل تعیین توالی و توالی پپتیدهای نمایش یافته روی فاژهای جداشده به‌دست آمد. در نهایت توالی پپتیدهای جداشده برای تعیین برخی ویژگی‌های مهم با روش‌های بیوانفورماتیکی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت رده‌های سلولی

در این تحقیق از SW480 (آدنوکارسینومای روده انسانی) به‌عنوان رده سلولی هدف و از HF-SF-PI3 (فیبروبلاست طبیعی انسانی)، AGS (آدنوکارسینومای معده انسانی)، KYSE-30 (کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری انسانی) و Huh-7 (کارسینومای کبد انسانی) به‌عنوان سلول‌های شاهد استفاده شد. رده‌های سلولی ذکر شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. برای کشت سلول‌های SW480، HF-SF-PI3، AGS و Huh-7 از محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) استفاده شد. برای کشت سلول‌های KYSE-30 از محیط RPMI-1640 (Gibco، آمریکا) حاوی سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین و استرپتومایسین (با مقادیر ذکر شده در بالا) استفاده شد. فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی سلول‌های کشت داده شده در انکوباتور مرطوب دارای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شد. سلول‌ها پس از افزایش تعداد و پر کردن قسمت عمده فلاسک با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد–EDTA ۰/۰۲ درصد (Trypsin- Ethylenediaminetetraacetic Acid) پاساژ داده شدند.

کتابخانه نمایش فاژی

کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی (Ph.D.™-7 Phage Display Peptide Library) از شرکت New England BioLabs (آمریکا) خریداری شد. از غربالگری این کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای اختصاصی متصل شونده به رده سلولی SW480 استفاده شد. برای ساخت کتابخانه مزبور از ناقل فاژی M13KE– که مشتقی از ناقل M13mp19 است– استفاده شده است. توالی‌های پپتیدی تصادفی هفت اسیدآمینه‌ای (heptatpeptide) در انتهای آمین (N-terminus) پروتئین پوششی غیر اصلی (Minor Coat Protein) فاژ M13KE موسوم به pIII همسانه‌سازی شده است و بنابراین پپتیدهای موجود در کتابخانه به‌صورت فیوژن با pIII در سطح فاژ نمایش می‌یابد [۱۷]. کتابخانه پپتیدی مورد اشاره، پنج ظرفیتی (Pentavalent) است؛ بدین‌معنا که هر پنج نسخه پروتئین III موجود در یک ویریون فاژی بالغ، پپتید همسانه‌سازی شده را در سطح خود نمایش می‌دهد. تعداد همسانه‌های فاژی موجود در این کتابخانه $۱/۲۸ \times ۱۰^{۹}$ است که این تعداد تقریباً تمامی توالی‌های پپتیدی ممکن قابل ساخت از یک توالی هفت اسیدآمینه‌ای تصادفی را در بر می‌گیرد.

سویه باکتریایی که به‌عنوان میزبان برای تکثیر فاژهای کتابخانه استفاده شد ER2738 بود. این سویه مشتق از باکتری اشریشیا کلی (*E.coli*) دارای پیلوس جنسی (F^+) و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین بود و از سرعت رشد بسیار بالایی برخوردار بود.

تکثیر، استخراج و تعیین تیتر فاژها

برای تکثیر فاژها به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری ER2738 که به مرحله رشد لگاریتمی (تصاعدی) رسیده، ۱×۱۰^{۱۰} pfu فاژ افزوده شد و به‌مدت ٤/٥ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور همراه با تکان (Shake) قرار داده شد. برای رسوب ذرات فاژی، PEG8000-NaCl (محلول ۲۰ درصد حجمی وزنی Polyethylene Glycol در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

NaCl با غلظت ۲/۵ مولار) به میزان یک ششم حجم به محلول حاوی باکتری و فاژ اضافه و سپس ۲ ساعت روی یخ قرار داده شد. ذرات فاژی با سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. رسوب فاژی به‌دست آمده در یک میلی‌لیتر محلول TBS (Tris Buffered Saline) حاوی NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار و Tris ۵۰ میلی‌مولار با pH= ۷/۵ حل شد. این کار دو بار تکرار شد تا در نهایت تمامی سلول‌های باکتریایی و اجزای باقیمانده آن‌ها حذف شود و تمامی ذرات فاژی موجود در محلول رسوب کند. در نهایت فاژهای تکثیر شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد یا منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد (با افزودن حجم برابر گلیسرول) نگهداری شد [۱۷].

برای تعیین تیتر محلول‌های فاژی از تهیه رقت‌های سریال و روش غربالگری پلاک‌های آبی- سفید (Blue-White Screening) استفاده شد. بدین‌منظور رقت‌های سریال (Serial Dilutions) از محلول فاژی مورد نظر در محیط LB تهیه شد. هر رقت به باکتری ER2738 کشت داده (در فاز لگاریتمی) اضافه و محلول فوق به‌مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. این زمان به فاژها فرصت می‌دهد تا سلول‌های باکتریایی را مورد عفونت قرار دهند. ۳ میلی‌لیتر محیط Top Agar ذوب شده (قرار داده شده در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد) به محلول حاوی باکتری و فاژ افزوده شد و سپس محلول فوق روی پلیت‌های LB-Tet حاوی IPTG (Isopropyl-B-D-Thiogalactoside) (AppliChem، آلمان) و Xgal (5-Bromo -4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (Fermentas، آمریکا) پخش شد. پلیت‌ها به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. با شمارش تعداد پلاک‌های آبی ظاهر شده روی پلیت‌ها و استفاده از فرمول زیر، تیتر محلول‌های فاژی بر حسب pfu/ میلی‌لیتر تعیین شد.

$$\text{(میکرولیتر) } \times ۱۰۰۰ \times \frac{\text{ضریب رقت} \times \text{تعداد پلاک‌ها}}{\text{حجم برده شده روی پلیت (میکرولیتر)}}$$

غربالگری کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی فاژهای متصل شونده به رده سلولی SW480

برای انجام بیوپنینگ و غربالگری کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی، از SW480 به‌عنوان سلول هدف و AGS، KYSE-30، Huh-7 و فیبروبلاست به‌عنوان سلول‌های شاهد برای حذف (Subtraction) فاژهای غیراختصاصی نسبت به سلول هدف استفاده شد. این بیوپنینگ منفی یا کاهشی (Subtractive Biopanning) موجب حذف فاژهای نمایش دهنده پپتیدهای غیر اختصاصی از مجموعه پپتیدهای موجود در کتابخانه می‌شود. برای انجام هر دور بیوپنینگ، تعداد ٦۰۰۰۰۰ سلول در چاهک‌های پلیت شش خانه (Six-Well Plates) ریخته شد. چاهک حاوی نمونه شاهد شامل مخلوطی از هر چهار نوع سلول شاهد به تعداد برابر (۱۵۰۰۰۰ از هر نوع سلول) بود. یک روز بعد محیط رویی سلول‌ها برداشته شد و چاهک حاوی سلول هدف و چاهک حاوی سلول‌های شاهد با PBS شستشو داده شد. سلول‌ها به‌مدت یک ساعت با محیط کشت فاقد سرم تیمار شدند. سپس بافر مسدود کننده (Blocking Buffer) متشکل از BSA یک درصد تهیه شده در PBS به چاهک‌ها اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از کتابخانه فاژی Ph.D.™-7 (دارای $۱۰^{۱۱}$ ویریون فاژی) حل شده در بافر مسدود کننده به چاهک حاوی سلول‌های شاهد اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول رویی که حاوی فاژهای متصل نشده به سلول‌های شاهد بود، برداشته شد و به چاهک حاوی سلول SW480 اضافه و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای حذف فاژهای متصل نشده به سلول هدف، سلول‌ها سه بار با BSA یک درصد و سه بار با PBS شستشو داده شدند. برای بازیابی و جداسازی فاژهای متصل شده به سلول‌های SW480، بافر Elution حاوی محلول گلیسین ۰/۲ مولار با pH اسیدی (۲/۰ مول گلایسین/ HCL، pH= ۲/۲) به چاهک اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس از Tris-HCl ۲ مولار برای

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

خنثی‌سازی بافر Elution استفاده شد. فاژهای بازیابی شده با مورد عفونت قرار دادن باکتری ER2738 تکثیر شدند و سپس تیتر آن‌ها تعیین شد. محلول فاژی تکثیر شده برای استفاده در مراحل بعدی بیوپنینگ، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مجموع سه دور پنینگ منفی روی سلول‌های شاهد و سه دور غربالگری مثبت روی سلول‌های SW480 انجام گرفت.

انجام Plaque-PCR برای تکثیر منطقه کد کننده پپتیدهای نمایش یافته در ژنوم فاژ

برای تکثیر قسمتی از ژنوم فاژهای موجود در هر پلاک، روی تمامی پلاک‌ها Plaque-PCR انجام شد. طراحی آغازگرها (Primers) برای انجام PCR به گونه‌ای صورت گرفت که منطقه تکثیرشده از ژنوم فاژ در برگیرنده توالی نوکلئوتیدی کد کننده پپتید نمایش یافته روی سطح فاژ باشد. برای طراحی آغازگرهای جلویی (Forward Primer) و برگشتی (Reverse Primer)، ابتدا توالی ناقل فاژی M13KE از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank استخراج و سپس طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oilgo 7 version انجام شد. جدول ۱ نشان دهنده توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی مورد استفاده برای تکثیر قسمتی از ژنوم فاژ است. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مخلوط PCR به حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۳۰ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase 2X Master Mix Red (Amplicon، دانمارک)، ۱۵ میکرولیتر آب مقطر و ۲/۵ میکرولیتر از هریک از آغازگرها (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر) تهیه شد. سپس نوک سرسمپلر تماس مختصری با پلاک فاژی موجود روی پلیت داده شد و سپس در مخلوط PCR فرو برده شد. *Taq* DNA Polymerase 2X Master Mix red حاوی *Taq* DNA Polymearse Amplicon، بافر ۱۰x PCR، dNTP و $MgCl_2$ (۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌مولار) است. پس از واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، برنامه زیر برای ۳۰ چرخه استفاده شد: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشتگی DNA، دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال (Annealing) آغازگرها به رشته الگو، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر (Extension). تکثیر نهایی نیز به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای مشاهده باند DNA مربوط به قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد تحت الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide)، ژل مربوط در دستگاه Gel Documentation در معرض تابش نور ماورای بنفش قرار گرفت.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر منطقه ژنومی فاژ M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی کد کننده پپتید نمایش یافته روی سطح فاژ

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

تخلیص و تعیین توالی محصول PCR

قطعات DNA تکثیرشده از تمامی ۲۸ پلاک، قبل از ارسال برای تعیین توالی تخلیص شد. برای تخلیص قطعات DNA از کیت تخلیص DNA از ژل (Gel Purification Kit) (GeneAll، کره جنوبی) استفاده شد. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد حاوی چاهک‌های بزرگ برده شد. ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR در داخل چاهک‌های مزبور قرار داده شد و به‌مدت ٤٠ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. با استفاده از یک اسکالپل استریل، باند موردنظر از روی ژل بریده و در داخل یک میکروتیوب استریل قرار داده شد. پس از ذوب ژل حاوی باند DNA و شستشو با بافرهای موجود در کیت، محصول PCR تخلیص شده به‌دست آمد. میکروتیوب حاوی محصول PCR تخلیص شده برای تعیین توالی ارسال شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده کد کننده پپتیدهای اختصاصی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

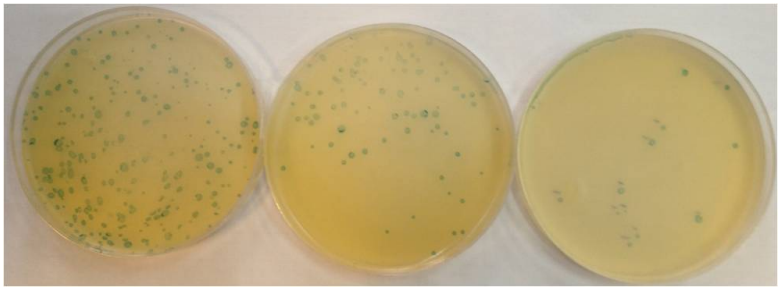
شناسایی توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480 و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پپتیدهای به‌دست آمده

برای شناسایی توالی آمینواسیدی پپتیدهای به‌دست آمده از بیوپنینگ، از پایگاه اطلاعاتی ExPASy (http://web.expasy.org/translate) استفاده شد. برای انجام تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی روی توالی پپتیدهای جدا شده، نرم‌افزار ClustalW2 (برای هم‌ردیفی توالی‌های پپتیدی) استفاده شد. همچنین از پایگاه اطلاعاتی SAROTUP (Scanner and Reporter of Target-Unrelated Peptides) به آدرس http://immunet.cn/sarotup که حاوی مجموعه‌ای از نرم‌افزارهای اختصاصی برای بررسی توالی‌های جدا شده از کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی است، برای بررسی و تعیین برخی ویژگی‌های توالی‌های پپتیدی متصل شونده به سلول SW480 استفاده شد.

نتایج

بیوپنینگ برای جداسازی فاژهای متصل شونده به سلول SW480

با انجام سه دور بیوپنینگ، در نهایت فاژهایی که واجد قابلیت اتصال به سلول‌های SW480 بود، جداسازی شد. در هر دور بیوپنینگ، فاژهای متصل نشده با استفاده از PBS-BSA (یک درصد) شستشو شد و از مجموعه فاژی حذف شد. فاژهای متصل شده به سلول هدف با استفاده از محلول اسیدی گلیسین ۰/۲ مولار بازیابی شد و با استفاده از سویه باکتریایی ER2738 تکثیر شد تا برای دور بعدی بیوپنینگ استفاده شود. برای حذف فاژهای غیراختصاصی از سلول‌های طبیعی فیبروبلاست انسانی استفاده شد. فیبروبلاست‌ها یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین سلول‌های بدن است و حضور آن‌ها به‌عنوان رده سلولی شاهد می‌تواند به میزان قابل توجهی فاژهای متصل شونده به سلول‌های طبیعی بدن را از کتابخانه حذف نماید [۱۸]. همچنین سه رده سلولی سرطانی AGS، KYSE-30 و Huh-7 نیز برای حذف فاژهای غیر اختصاصی استفاده شد. در نهایت فاژهای بازیابی شده از دور سوم بیوپنینگ با سویه باکتریایی میزبان آلوده شد و روی پلیت‌های IPTG-Xgal حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین برده شد. فاژهای مزبور به‌صورت پلاک‌های آبی در پلیت قابل مشاهده است (شکل ۱). با افزایش تعداد دورهای پنینگ، تعداد دفعات شستشو برای جداسازی فاژهای متصل نشده به سلول هدف نیز افزایش یافت. این امر موجب می‌شود تا تنها فاژهایی که از میل ترکیبی بالایی برای اتصال به سلول‌های SW480 برخوردار هستند، باقی بمانند و فاژهایی که اتصال آن‌ها به سلول هدف غیر اختصاصی و با میل ترکیبی پایین است، طی مراحل مختلف شستشو از سلول هدف جدا شده و در نهایت از کتابخانه حذف شوند.

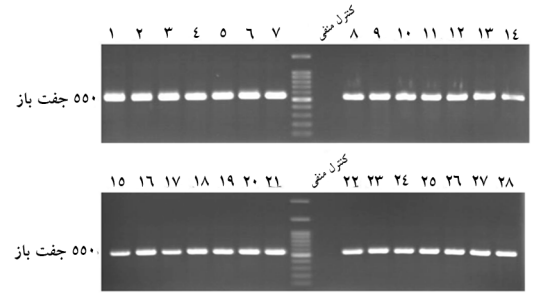


شکل ۱ پلاک‌های آبی حاصل از تعیین تیتر محلول فاژی به‌دست آمده از دور آخر بیوپنینگ روی پلیت‌های حاوی IPTG-Xgal؛ پلیت‌های مختلف نشان دهنده رقت‌های مختلف محلول فاژی است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Plaque-PCR و تکثیر توالی نوکلئوتیدی کد کننده پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480

فرآیند تعیین تیتر چندین بار روی محلول به‌دست آمده از دور آخر بیوپنینگ تکرار شد تا در نهایت پلیتی به‌دست آید که از نظر تعداد و پراکندگی پلاک‌ها مناسب باشد. پلیتی برای انتخاب پلاک‌ها استفاده شد که پراکندگی پلاک‌های فاژی در آن همگن و تعداد پلاک‌ها کمتر از ۱۰۰ باشد و پلاک‌ها کاملاً از هم جدا (Well-Isolated Plaques) باشند؛ در نتیجه هر پلاکی که انتخاب می‌شود واجد یک توالی DNA منحصر به فرد است. در نهایت پلیتی به‌دست آمد که واجد ۲۸ پلاک کاملاً مجزا بود. انجام PCR روی پلاک‌های مزبور موجب تکثیر یک باند ۵۵۰ جفت بازی شد (شکل ۲). سپس قطعات DNA تکثیر شده از تمامی ۲۸ پلاک قبل از ارسال برای تعیین توالی، تخلیص شد.



شکل ۲ الکتروفورز باند ۵۵۰ جفت بازی حاصل از تکثیر قسمتی از ژنوم فاژ M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی پپتید نمایش یافته روی سطح فاژ روی ژل آگارز یک درصد؛ اعداد نشان داده شده در شکل نمایانگر شماره پلاک‌های فاژی به‌دست آمده از دور آخر بیوپنینگ است.

به‌دست آوردن توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480

پس از دریافت نتایج تعیین توالی مربوط به ۲۸ پلاک به‌دست آمده از بیوپنینگ، توالی پپتیدهای نمایش یافته روی فاژهای جدا شده به‌دست آمد. بدین‌منظور ژنوم فاژ M13KE از وب سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank استخراج شد. سپس مقایسه و هم‌ردیفی توالی ژنوم فاژ M13KE با توالی هر یک از نمونه‌های تعیین توالی شده (مربوط به محصول PCR تکثیر شده) انجام شد. در نهایت توالی‌های نوکلئوتیدی کد کننده پپتیدهای همسانه شده شده به ژن شماره III فاژ M13KE به‌دست آمد. ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی فوق با استفاده از نرم‌افزار Translate در پایگاه ExPASy به آدرس اینترنتی (http://web.expasy.org/translate) منجر شد تا در نهایت توالی پپتیدهای نمایش یافته روی فاژهای به‌دست آمده از دور آخر بیوپنینگ به‌دست آید. در جدول ۲ مشخصات پپتیدهای به‌دست آمده از بیوپنینگ- توالی و فراوانی- نشان داده شده است. همسانه‌های فاژی به‌صورت PC1، PC2 و ... و پپتیدهای نمایش یافته روی این همسانه‌های فاژی به‌صورت SW-Pep1، SW-Pep2 و ... نام‌گذاری شدند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بیوپنینگ کتابخانه فاژی Ph.D.™-7 روی سلول SW480 و نیز رده‌های سلولی شاهد در نهایت منجر به جداسازی ۱٤ نوع توالی پپتیدی شد. پپتید SW-Pep1 از بالاترین فراوانی برخوردار بود و در مجموع ۸ همسانه فاژی جداشده با بیوپنینگ این پپتید را نمایش می‌دادند. پپتید SW-Pep2 با ٤ بار تکرار، پپتید SW-Pep3 با ۳ بار تکرار و پپتیدهای SW-Pep4 و SW-Pep5 با ۲ بار تکرار از نظر فراوانی در رتبه‌های بعد قرار داشتند. ۹ همسانه فاژی نیز دارای پپتیدهایی بودند که از فراوانی ۱ برخوردار بودند و در فرآیند بیوپنینگ تکرار نشده بودند. به‌طور کلی فراوانی بالاتر یک پپتید نشانگر غنی شدن (Enrichment) آن در حین انجام فرآیند بیوپنینگ است. این غنی شدن بیانگر میل ترکیبی بالا و اختصاصیت پپتید جدا شده در اتصال به ساختار هدف- در اینجا سلول سرطان کولون- است. بر این اساس می‌توان گفت پپتید SW-Pep1 که از فراوانی بالایی برخوردار می‌باشد و تقریباً یک سوم پپتیدهای جدا شده را به خود اختصاص می‌دهد، پپتیدی است که واجد میل ترکیبی و اختصاصیت بالایی در اتصال به سلول SW480 است. همچنین فراوانی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

پپتیدهای SW-Pep2 و SW-Pep3 نشان می‌دهد این دو پپتید از میل ترکیبی نسبی برای اتصال به سلول سرطان کولون برخوردار هستند؛ اما در مورد پپتیدهای دیگر نمی‌توان ادعا نمود که اختصاصیت و میل ترکیبی بالایی برای اتصال به سلول‌های SW480 دارند و بنابراین نمی‌توانند گزینه‌های مناسبی برای مطالعات بعدی محسوب شوند.

جدول ۲ اسامی همسانه‌های فاژی جدا شده در بیوپنینگ، اسامی پپتیدهای نمایش یافته توسط همسانه‌های فاژی مزبور، توالی اسید آمینه‌ای پپتیدهای جدا شده و فراوانی آن‌ها

همسانه فاژی	نام پپتید	توالی اسید آمینه‌ای پپتید	فراوانی	درصد فراوانی
PC-5, PC-9, PC-10, PC-11, PC-12, PC-15, PC-24, PC-28	SW-Pep1	**HAMRA**QP	۸	۲۹
PC-14, PC-18, PC-21, PC-27	SW-Pep2	N**APDWPA**	٤	١٤/٥
PC-1, PC-8, PC-25	SW-Pep3	**SPS**THWK	۳	۱۱
PC-4, PC-7	SW-Pep4	**STSFWIT**	۲	۷
PC-16, PC-26	SW-Pep5	NE**SHS**RT	۲	۷
PC-2	SW-Pep6	GFFHKTT	۱	۳/٥
PC-3	SW-Pep7	L**PA**GRVL	۱	۳/٥
PC-6	SW-Pep8	NGLTAWT	۱	۳/٥
PC-13	SW-Pep9	**AAPDW**AG	۱	۳/٥
PC-17	SW-Pep10	**HAKRA**RA	۱	۳/٥
PC-19	SW-Pep11	TLH**PAA**D	۱	۳/٥
PC-20	SW-Pep12	HVQL**WAT**	۱	۳/٥
PC-22	SW-Pep13	S**AAI**GTL	۱	۳/٥
PC-23	SW-Pep14	LSNNNLR	۱	۳/٥

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480

انجام تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی روی پپتیدهای به‌دست آمده، یکی از بخش‌های مهم هر آزمون بیوپنینگ است [۱۹]. این بررسی‌ها با هدف شناسایی موتیف‌های اسید آمینه‌ای مشترک (Consensus Amino Acid Motifs) در پپتیدهای جداشده و نیز بررسی اختصاصیت پپتیدهای مزبور در اتصال به سلول هدف (cell-specificity) انجام می‌شود.

برای پیدا کردن موتیف‌های مشترک بین پپتیدهای به‌دست آمده از بیوپنینگ، از نرم‌افزار ClustalW2 استفاده شد. جدول ۳ نشان دهنده هم‌ردیفی توالی‌های پپتیدی است. هم‌ردیفی پپتیدها نشان دهنده وجود چند موتیف اسید آمینه‌ای مشترک بود. در بررسی موتیف‌های اسید آمینه‌ای در پپتیدهای به‌دست آمده از کتابخانه‌های فاژی باید به دو ویژگی موتیف‌های مزبور توجه ویژه داشت. الف) موتیف‌هایی که از سه یا تعداد بیشتری اسید آمینه تشکیل شده باشند. ب) موتیف‌هایی که در تعداد بیشتری از همسانه‌های فاژی موجود باشند. بر اساس دو ویژگی مورد اشاره- طول موتیف و فراوانی همسانه‌های فاژی واجد موتیف- دو موتیف مهم در پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480 مشاهده شد؛ یکی موتیف چهار آمینواسیدی APDW (Tetra Amino Acid Motif) و دیگری موتیف چهار آمینواسیدی HAXRA (X= M,K) که اولی در پنج همسانه فاژی و دومی در نه همسانه فاژی وجود داشت. موتیف‌هایی مانند SXS (X= T, H, P) به دلیل طول کم، چندان قابل اهمیت نبوده است و بنابراین گزینه‌های مناسبی برای کاربردهای آینده نیستند. وجود موتیف‌های آمینواسیدی مشترک در کنار تکرار برخی توالی‌های پپتیدی (که در قسمت قبل مورد اشاره قرار گرفت)، بیانگر آنست که فرآیند بیوپنینگ موجب جداسازی همسانه‌های فاژی و در نتیجه جداسازی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

پپتیدهایی شده است که از قابلیت بالایی در اتصال به سلول SW480 برخوردار است.

جدول ۳ هم‌ردیفی توالی‌های پپتیدی به‌دست آمده از بیوپنینگ که نشان دهنده موتیف‌های آمینواسیدی مشترک بین پپتیدهای جدا شده است.

اسامی پپتیدها	توالی پپتیدها
SW-Pep1	**HA**M**RA**QP
SW-Pep10	**HAKRA**RA
SW-Pep2	N**APDWPA**
SW-Pep9	**AAPDW**AG
SW-Pep7	L**PA**GRVL
SW-Pep11	TLH**PAA**D
SW-Pep13	S**AAI**GTL
SW-Pep8	NGLTAWT
SW-Pep14	LSNNNLR
SW-Pep3	**SPS**THWK
SW-Pep12	HVQL**WA**T
SW-Pep5	NE**SHS**RT
SW-Pep4	**STSFWIT**
SW-Pep6	GFFHKTT

برای بررسی این‌که پپتیدهای جدا شده در مطالعه حاضر جدید هستند یا قبلاً گزارش شده‌اند، از نرم‌افزار MimoDB در پایگاه اطلاعاتی SAROTUP (قابل دسترس در http://immunet.cn/mimodb/) استفاده شد. پایگاه SAROTUP که در سال ۲۰۱۰ راه‌اندازی شده است، کامل‌ترین و جامع‌ترین پایگاه اطلاعاتی در مورد پپتیدهای به‌دست آمده از کتابخانه‌های فاژی پپتیدی است و در برگیرنده تمامی پپتیدهای به‌دست آمده از غربالگری کتابخانه‌های فاژی پپتیدی است که در مقالات گزارش شده‌است. همچنین در این پایگاه اطلاعات تکمیلی همچون عامل هدف مورد استفاده در بیوپنینگ، نوع کتابخانه غربال شده و ... موجود است [۲۰].

بررسی توالی‌های پپتیدی به‌دست آمده از مطالعه حاضر با نرم‌افزار MimoDB نشان داد که از مجموع چهارده پپتید به‌دست آمده، دوازده پپتید جدید بوده و تاکنون در هیچ مطالعه‌ای که در آن‌ها از بیوپنینگ کتابخانه‌های فاژی پپتیدی استفاده شده، گزارش نشده‌است. این امر می‌تواند ناشی از پیچیدگی و نیز تنوع و تغییرپذیری گیرنده‌های سطحی سلول‌های روده باشد. اما بررسی در MimoDB نشان داد که دو پپتید SW-Pep11 (با توالی TLH**PAA**D) و SW-Pep14 (با توالی LSNNNLR) قبلاً در بیوپنینگ کتابخانه فاژی 7-Ph.D.™ به‌ترتیب روی پلیمر اپوکسی [۲۱] و دی اکسید سیلیکون SiO_2 [۲۲] به‌دست آمده‌است. از آن‌جا که دو پپتید مزبور هم در غربالگری کتابخانه فاژی 7-Ph.D.™ روی سلول‌های سرطانی روده و هم روی مولکول‌های ذکر شده در بالا جدا شده‌است، نمی‌توانند به‌طور اختصاصی به سلول‌های SW480 متصل شوند.

یکی از مشکلات غربالگری کتابخانه‌های فاژی پپتیدی، امکان جداسازی پپتیدهای مثبت کاذب (False Positive Peptides) است. به این پپتیدها "پپتیدهای غیرمرتبط با هدف" (Target Unrelated Peptides) یا به اختصار TUPs گفته می‌شود [۲۳]. شناسایی توالی‌های TUP یکی از موارد بسیار مهمی است که باید در گزارش پپتیدهای متصل شونده به سلول هدف در بیوپنینگ کتابخانه‌های فاژی مورد توجه قرار گیرد. جداسازی همسانه‌های فاژی واجد توالی‌های TUP، به دلایلی غیر از اتصال اختصاصی به عامل هدف روی می‌دهد. در نتیجه همسانه‌های فاژی که واجد TUP هستند، دارای اختصاصیت و میل ترکیبی بالایی برای اتصال به عامل هدف (در این‌جا سلول SW480) نیستند. علت جداسازی توالی‌های TUP در فرآیند بیوپنینگ آنست که فاژهای واجد پپتیدهای TUP از کارآیی بیشتری در عفونی‌سازی سلول باکتریایی میزبان، از سرعت تکثیر بالاتر یا از قابلیت تجمع (Assembly) بالاتر برخوردار هستند [۲٤]. بررسی توالی‌های پپتیدی حاصل از بیوپنینگ کتابخانه 7-Ph.D.™ روی سلول SW480 با استفاده از نرم‌افزار TUPredict در پایگاه اطلاعاتی SAROTUP نشان داد که بیشتر توالی‌های پپتیدی متصل شونده به سلول SW480 که در مطالعه حاضر به‌دست آمده‌است، جزء پپتیدهای TUP نیست. این امر بیانگر آنست که جداسازی این پپتیدها به علت میل ترکیبی بالا و اختصاصیت آن‌ها در اتصال به سلول‌های SW480 است. البته دو پپتید SW-Pep11 و SW-Pep14 به علت آن‌که قابلیت اتصال به هدف‌های متفاوتی را دارد (همان‌طور که پیشتر اشاره شد) نمی‌توانند حاصل اتصال اختصاصی به سلول‌های SW480 باشند؛ بنابراین با این‌که جزء توالی‌های TUP محسوب

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

نمی‌شوند، اما باید آن‌ها را از فهرست پپتیدهای اختصاصی متصل شونده به سلول SW480 خارج نمود.

بحث

یکی از مشکلات بسیار مهم درمان سرطان، عدم اختصاصیت روش‌های درمانی مورد استفاده است. سلول‌های سرطانی اغلب در سطح خود واجد مولکول‌هایی موسوم به آنتی‌ژن‌های اختصاصی تومور (Tumor-Associated Antigens) هستند که موجب تمایز سلول‌های فوق از سلول‌های طبیعی بدن می‌شوند [۲۵]. هدایت عوامل تشخیصی و دارویی به سوی آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های توموری یکی از شیوه‌های بسیار کارآمد برای افزایش اختصاصیت روش‌های مورد استفاده برای درمان سرطان بوده است و نقش بسیار مهمی را در راستای درمان کارآمدتر سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند.

سرطان روده یکی از شایع‌ترین انواع بدخیمی‌ها است. ورود خوراکی (Oral Administration) داروها به سلول‌های سرطانی روده یکی از شیوه‌های بسیار مناسب برای درمان این بدخیمی است. ناپایداری دارو در محیط درونی دستگاه گوارش و نفوذپذیری اندک مرز مخاطی روده (Intestinal Mucosal Barrier)، از موانع بسیار جدی بر سر راه رسانش خوراکی داروها به سلول‌های آسیب دیده و بیمار روده است [۲۶]. یکی از شیوه‌های بسیار مؤثر برای برطرف نمودن این مشکل، استفاده از لیگاندهای واجد قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی روده است. جداسازی و شناسایی ترکیباتی که به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های سرطانی روده می‌چسبند، می‌تواند به میزان قابل توجهی موجب افزایش کارآمدی روش‌های درمانی شود. روش‌های مختلفی برای شناسایی لیگاندهای هدفمند کننده (Targeting Ligands) استفاده شده است. در میان این رویکردها، روش نمایش فاژی از جایگاه با اهمیتی برخوردار است. این روش ابزاری بسیار قدرتمند است که امکان غربالگری با توان بازدهی بالا برای شناسایی و جداسازی لیگاندهای اختصاصی متصل شونده به انواع سلول‌ها و بافت‌های هدف را فراهم می‌آورد. از کتابخانه‌های فاژی پپتیدی که طیف وسیعی از پپتیدهای دارای ویژگی‌های اتصالی منحصر به فرد را نمایش می‌دهد، می‌توان برای جداسازی و انتخاب لیگاندهای پپتیدی با اختصاصیت (Selectivity) و میل ترکیبی (Affinity) بالا نسبت به انواع سلول‌های سرطانی استفاده نمود [۷]. بر همین اساس، تاکنون از غربالگری کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای اختصاصی سلول‌های سرطانی بافت‌های مختلف استفاده شده است. یکی از مزایای استفاده از کتابخانه‌های فاژی برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول‌ها و بافت‌های مختلف، عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه و پیشین (Prior Knowledge) از گیرنده‌های موجود در سطح سلول‌های هدف است [۲۷]. عدم نیاز به آگاهی از ویژگی‌های سطحی سلول‌های هدف موجب تسهیل فرآیند شناسایی لیگاندهای هدفمند کننده می‌شود.

در این مطالعه از غربالگری کتابخانه پپتیدی Ph.D.™-7 برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول SW480 (سلول آدنوکارسینومای روده انسان) استفاده شد. در شیوه مورد استفاده در این تحقیق در هر دور غربالگری کتابخانه فاژی، از بیوپنینگ همزمان مثبت (روی سلول هدف) و منفی (روی سلول‌های شاهد) استفاده شد. این شیوه بیوپنینگ قبلاً توسط لیانگ (Liang) و همکارانش استفاده شده است [۲۸]. البته محققان حاضر تغییراتی در پروتکل مورد استفاده آن‌ها ایجاد نمودند. در بسیاری از روش‌های مورد استفاده برای غربالگری کتابخانه‌های فاژی، تعداد دورهای بیوپنینگ مثبت و منفی با هم برابر نیست. در ضمن غربالگری‌های مثبت و منفی به‌صورت جدا از هم انجام می‌شود؛ بدین ترتیب که ابتدا تمامی دورهای بیوپنینگ منفی روی سلول(های) شاهد انجام و سپس بیوپنینگ مثبت روی سلول هدف انجام می‌شود؛ اما در مطالعه کنونی از بیوپنینگ مثبت و منفی به‌صورت همزمان در یک دور بیوپنینگ استفاده شد. این شیوه بیوپنینگ که در آن غربالگری‌های منفی و مثبت در تمامی دورهای بیوپنینگ و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

به‌صورت همزمان و با تعداد یکسان انجام می‌شود، موجب اعمال شرایط سخت‌تر در فرآیند بیوپنینگ، ایجاد فشار انتخابی قوی‌تر، افزایش کارآمدی حذف پپتیدهای غیراختصاصی و در نتیجه جداسازی پپتیدهای با اختصاصیت بالاتر نسبت به سلول هدف می‌شود.

یکی از مهم‌ترین کاربردهای پپتیدهای به‌دست آمده در فرآیند بیوپنینگ، استفاده از آن‌ها برای رسانش هدفمند عوامل درمانی به سلول‌های توموری است. برای محقق شدن این هدف، پپتیدهای جداشده در غربالگری کتابخانه‌های فاژی باید از قابلیت اتصال به سلول‌های توموری برخوردار باشند و در عین‌حال به سلول‌های طبیعی بدن متصل نشوند. همچنین در بین سلول‌های توموری نیز باید قادر به اتصال اختصاصی به سلول‌های توموری بافت هدف- در این‌جا بافت روده- باشند. بر همین اساس، در این تحقیق با انجام بیوپنینگ منفی روی سلول‌های شاهد پپتیدهایی که قادر به اتصال به سلول‌های طبیعی و نیز سلول‌های سرطانی متعلق به بافت‌هایی غیر از روده بودند، از کتابخانه پپتیدی حذف شدند. در فرآیند بیوپنینگ، جداسازی پپتیدهای اختصاصی براساس ویژگی‌ها و مشخصات سطحی سلول‌ها صورت می‌گیرد. دو رده سلولی KYSE-30 و AGS که جزء سلول‌های شاهد مورد استفاده بودند، به‌ترتیب متعلق به بافت‌های مری و معده بودند. طبیعتاً انتظار می‌رود سلول‌های موجود در سیستم گوارشی به لحاظ ویژگی‌های سطحی دارای مشابهت‌های زیادی با هم باشند. از آن‌جا که سلول هدف ما در این تحقیق سلول روده بود، استفاده از سلول‌های گوارشی مری و معده برای انجام بیوپنینگ منفی موجب می‌شود تا در نهایت پپتیدهایی انتخاب شود که تمایلی برای اتصال به دیگر سلول‌های دستگاه گوارش نداشته باشد. این امر موجب افزایش قابلیت پپتیدهای جداشده برای کاربردهای In vivo می‌شود. همچنین گزارش شده که بافت کبد تمایل به جذب غیراختصاصی فاژها در In vivo دارد. علت این امر وجود سیستم رتیکولوآندوتلیال (Reticuloendothelial System) در این بافت است [۲۹].

بر همین اساس سلول Huh-7 به‌عنوان یکی دیگر از سلول‌های شاهد انتخاب شد تا فاژهایی که به‌صورت غیراختصاصی به عناصر سطحی سلول‌های کبدی متصل می‌شود حذف شود. فیبروبلاست‌ها سلول‌هایی طبیعی هستند که به تعداد بسیار زیاد در بدن وجود دارند. بر همین اساس می‌توان از فیبروبلاست به‌عنوان سلولی که نماینده ویژگی‌های سطحی بسیاری از سلول‌های طبیعی بدن است، استفاده نمود [۱۸]. استفاده از سلول‌های فیبروبلاست به‌عنوان سلول شاهد موجب می‌شود فاژهایی که به‌صورت غیراختصاصی به سطح سلول‌های طبیعی اتصال پیدا نموده‌اند، از کتابخانه حذف شوند. در مجموع سعی شد با انتخاب رده‌های سلولی مناسب احتمال انتخاب پپتیدهایی که به‌صورت اختصاصی و با میل ترکیبی بالا قادر به اتصال به سلول‌های SW480 باشد، افزایش یابد.

روشی که در این تحقق برای غربالگری کتابخانه فاژی استفاده شد، به‌صورت *In vitro* بود. بیوپنینگ به شیوه *In vitro* روی سلول‌های موجود در کشت سلول، روشی کارآمد است که در مقایسه با Panning *In vivo* از مزایایی برخوردار است. یکی از مشکلات Panning *In vivo* آنست که مویرگ‌های موجود در سیستم عروقی به‌عنوان مانعی برای عبور فاژها عمل می‌کند و بنابراین اغلب فاژهای به‌دست آمده به جای اتصال به خود سلول‌های توموری موجود در بافت هدف به سلول‌های آندوتلیال موجود در دیواره رگ‌های خونی بافت هدف متصل می‌شود. بر همین اساس، بسیاری از مطالعاتی که در آن‌ها از بیوپنینگ به شیوه *In vivo* استفاده شده منجر به جداسازی پپتیدهای اختصاصی سلول‌های آندوتلیال شده‌است [۳۰]. نکته دیگری که در مطالعه کنونی احتمال جداسازی پپتیدهای با میل ترکیبی بیشتر و اختصاصی‌تر نسبت به سلول‌های SW480 را افزایش می‌دهد، نوع کتابخانه پپتیدی انتخاب شده است. کتابخانه Ph.D.™-7 که در این پژوهش استفاده شد، بر اساس ناقل فاژی M13KE طراحی شده است. در این ناقل از pIII فاژی برای نمایش پپتیدهای خارجی استفاده می‌شود. هر ناقل فاژی دارای پنج نسخه از pIII است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

بنابراین هر ذره فاژی حاوی پنج نسخه نمایش یافته از هر پپتید است [۱۷]. برخی مواقع برای طراحی سیستم‌های نمایش فاژی از pVIII فاژی استفاده می‌شود که تقریباً ۲۷۰۰-۳۰۰۰ نسخه از آن روی هر فاژ وجود دارد. وقتی از pVIII برای نمایش پپتیدها استفاده می‌شود، تعداد نسخه‌های بسیار بیشتری از پپتید مربوط روی سطح فاژ نمایش می‌یابد. این تعداد بیشتر نسخه‌های نمایش یافته موجب می‌شود که احتمال جداسازی پپتیدهایی که دارای میل ترکیبی پایینی نسبت به هدف است، افزایش یابد. در حالی که نمایش تنها پنج نسخه از پپتید خارجی روی ذره فاژی موجب می‌شود که غربالگری سیستم Ph.D.™-7 بر روی سلول SW480 موجب جداسازی لیگاندهای پپتیدی دارای میل ترکیبی بالا (High Affinity Ligands) نسبت به سلول فوق شود.

همچنین از آن‌جا که قبلاً نشان داده شده بود احتمال جداسازی و انتخاب پپتیدهای TUP در کتابخانه فاژی Ph.D.™-7 وجود دارد [۳۱]، توالی‌های پپتیدی به‌دست آمده از طریق پایگاه SAROTUP بررسی شد. وجود پپتیدهای TUP موجب بروز مشکل در تجزیه و تحلیل‌ها و بررسی‌های بعدی می‌شود. عدم وجود توالی‌های مشابه توالی‌های پپتیدی ما در این پایگاه بیانگر آنست که بیشتر پپتیدهای به‌دست آمده در مطالعه حاضر جزء پپتیدهای TUP نبوده و جداسازی آن‌ها به علت میل ترکیبی و اختصاصیت بالای آن‌ها در اتصال به سلول SW480 است. در مجموع می‌توان گفت نتایج مطالعه حاضر بیانگر آنست که پروتکل بیوپنینگ مورد استفاده منجر به جداسازی پپتیدهایی شده که از قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان کولون برخوردار هستند. در بین پپتیدهای به‌دست آمده، پپتید SW-Pep1 به دلیل فروانی بالاتر و غنی‌سازی کارآمدتر در فرآیند بیوپنینگ می‌تواند لیگاند اختصاصی مناسبی برای اتصال به سلول‌های سرطان کولون باشد. این امر نشان می‌دهد پپتید SW-Pep1 از این مزیت برخودار است که به‌عنوان لیگاندی اختصاصی برای رسانش هدفمند ترکیبات تشخیصی و درمانی مورد استفاده قرار گیرد و بنابراین می‌تواند واجد کاربردهای بالقوه‌ای در زمینه تشخیص و درمان هدفمند سرطان روده باشد. بدون تردید استفاده از این پپتید برای کاربردهای بالینی نیازمند بررسی‌های بیشتر به ویژه مطالعات In vivo در راستای بررسی توانایی آن در اتصال به تومورهای کولون زنوگرافت (Xenograft) انسانی ایجاد شده در مدل‌های موشی است.

تشکر و قدردانی

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

منابع

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

[2] Cochran R, Cochran F. Phage display and molecular imaging: expanding fields of vision in living subjects. Biotechnol Genet Eng Rev 2010; 27: 57-94.

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

[4] Newton J, Deutscher SL. Phage peptide display. Handb Exp Pharmacol 2008; (185 Pt 2): 145-63.

[5] Brown KC. Peptidic tumor targeting agents:

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[14] Prenen H, Vecchione L, Van Cutsem E. Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer. Target Oncol 2013; 8(2): 83-96.

[15] Teesalu T, Sugahara KN, Ruoslahti E. Tumor-penetrating peptides. Front Oncol 2013; 3: 216.

[16] Gray BP, Brown KC. Combinatorial peptide libraries: mining for cell-binding peptides. Chem Rev 2014; 114(2): 1020-81.

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

[18] Samoylova TI, Petrenko VA, Morrison NE, Globa LP, Baker HJ, Cox NR. Phage probes for malignant glial cells. Mol Cancer Ther 2003; 2(11): 1129-37.

[19] Huang J, Ru B, Dai P. Bioinformatics resources and tools for phage display. Molecules 2011; 16(1): 694-709.

[20] Huang J, Ru B, Li S, Lin H, Guo FB. SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. J Biomed Biotechnol 2010; 2010: 101932.

[21] Swaminathan S, Cui Y. Recognition of epoxy with phage displayed peptides. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2013; 33(5): 3082-4.

[22] Swaminathan S, Bullough M, Li Q, Zhou A, Cui Y. Non-lithographic patterning of phage-displayed peptides with wrinkled elastomers. J R Soc Interface 2013; 11(91): 20130893.

[23] Menendez A, Scott JK. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. Anal Biochem 2005; 336(2): 145-57.

[24] Thomas WD, Golomb M, Smith GP. Corruption the road from phage display peptide selections to clinical applications. Curr Pharm Des 2010; 16(9): 1040-54.

[6] Krumpe LR, Mori T. The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. Int J Pept Res Ther 2006; 12(1): 79-91.

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

[8] Mori T. Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. Curr Pharm Des 2004; 10(19): 2335-43.

[9] Aina OH, Liu R, Sutcliffe JL, Marik J, Pan CX, Lam KS. From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. Mol Pharm 2007; 4(5): 631-51.

[10] Marin JJ, Sanchez de Medina F, Castaño B, Bujanda L, Romero MR, Martinez-Augustin O, Moral-Avila RD, Briz O. Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. Drug Metab Rev 2012; 44(2): 148-72.

[11] Patel SS, Floyd A, Doorly MG, Ortega AE, Ault GT, Kaiser AM, Senagore AJ. Current controversies in the management of colon cancer. Curr Probl Surg 2012; 49(7): 398-460.

[12] Sugarbaker PH. Colorectal cancer: prevention and management of metastatic disease. Biomed Res Int 2014; 2014: 782890.

[13] Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer -- an example of personalised medicine in action. Cancer Treat Rev 2013; 39(6): 592-601.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]

of phage display libraries by target-unrelated clones: diagnosis and countermeasures. Anal Biochem 2010; 407(2): 237-40.

[25] Haen SP, Rammensee HG. The repertoire of human tumor-associated epitopes--identification and selection of antigens and their application in clinical trials. Curr Opin Immunol 2013; 25(2): 277-83.

[26] Lambkin I, Pinilla C. Targeting approaches to oral drug delivery. Expert Opin Biol Ther 2002; 2(1): 67-73.

[27] Fievez V[1], Plapied L, Plaideau C, Legendre D, des Rieux A, Pourcelle V, Freichels H, Jérôme C, Marchand J, Préat V, Schneider YJ. In vitro identification of targeting ligands of human M cells by phage display. Int J Pharm 2010; 394(1-2): 35-42.

[28] Liang S, Lin T, Ding J, Pan Y, Dang D, Guo C, Zhi M, Zhao P, Sun L, Hong L, Shi Y, Yao L, Liu J, Wu K, Fan D. Screening and identification of vascular-endothelial-cell-specific binding peptide in gastric cancer. J Mol Med (Berl) 2006; 84(9): 764-73.

[29] Aina OH, Sroka TC, Chen ML, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. Biopolymers 2002; 66(3): 184-99.

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

[31] Ru B, 't Hoen PA, Nie F, Lin H, Guo FB, Huang J. PhD7Faster: predicting clones propagating faster from the Ph.D.-7 phage display peptide library. J Bioinform Comput Biol 2014; 12(1): 1450005.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-24]