

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

Babak Bakhshinejad<sup>1</sup>, Mohammad Khalaj-Kondori<sup>2</sup>, Saeedeh Ghiasvand<sup>1</sup>, Majid Sadeghizadeh<sup>3\*</sup>

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.<sup>TM</sup>-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

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

بابک بخشی‌نژاد<sup>۱</sup>، محمد خلچ کندری<sup>۲</sup>، سعیده قیاسوند<sup>۱</sup>، مجید صادقی‌زاده<sup>۳\*</sup>

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، کد پستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک  
Email: sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۴

دریافت مقاله: ۹۳/۰۳/۱۸

### چکیده

هدف: در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به کتابخانه‌های نمایش فاژی به عنوان ابزارهایی برای شناسایی و جداسازی مولکول‌های دارویی (با خواص تشخیصی و درمانی) شده است. کتابخانه‌های پپتیدی یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین انواع کتابخانه‌های نمایش فاژی هستند. هدف از انجام پژوهش حاضر غربالگری کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی ۷-Ph.D.<sup>TM</sup> از طریق فرآیند بیوپنیگ برای شناسایی لیگاندهای پپتیدی متصل شونده به سلول‌های SW480 (آدنوکارسینومای روده انسانی) بود.

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

نتایج: بیوپنیگ کتابخانه فاژی منجر به غنی‌سازی تعدادی پپتید شد که از بین آن‌ها توالی پپتیدی HAMRAQP دارای بیشترین فراوانی بود. بررسی بیوانفورماتیکی توالی‌های به دست آمده نشان داد که هیچ یک از آن‌ها جزء توالی‌های غیرمرتب 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، بیوپنیگ، پپتید، سرطان روده

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

### مقدمه

کننده یکی از پروتئین‌های پوششی فاژ همسانه‌سازی می‌شود.

این امر موجب می‌شود در سطح ویریون‌های فاژی بالغ، (پلی)

پپتید مورد نظر به صورت فیوژن با پروتئین پوششی فاژی

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

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳

## کتابخانه‌های فاژی و جداسازی پپتیدهای هدفمند کننده

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، پرتو درمانی و شیمی درمانی به عنوان روش‌های اصلی درمان این سرطان محسوب می‌شوند [۱۰-۱۲]. یکی از مشکلات بسیار مهم و جدی بسیاری از داروهای مورد استفاده برای شیمی درمانی، 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، ۱۴]. پپتیدها به علت اندازه کوچک، قابلیت بالا برای نفوذ به بافت‌ها به ویژه تومورهای سفت (Solid Tumors)، ایمنی زایی بسیار پایین و سهولت انجام انواع تعییرات شیمیایی برای افزایش پایداری، واحد ویژگی‌های فارماکوکیتیکی مطلوبی هستند [۱۵، ۱۶]. بر همین اساس پپتیدهای متصل Colon-Binding شونده به سلول‌های سرطانی روده (Peptides) از قابلیت بالایی برای استفاده در تشخیص و درمان هدفمند بدخیمی‌های روده برخوردار هستند. اتصال پپتیدهای مزبور به انواع داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی 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.<sup>TM-7</sup> از طریق روش بیوپنینگ برای جداسازی پپتیدهای متصل شونده به سلول‌های SW480 (رده سلولی آدنوکارسینومای روده انسانی) بود. انجام

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) به وجود 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) به منظور 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 به عنوان منبعی غنی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای دارویی (تشخیصی و درمانی) (Diagnostics And Therapeutics) استفاده شوند [۴، ۵]. 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 [۶، ۷]. بیوپنینگ می‌تواند به صورت In vivo (درون شیشه)، In vitro (برون تنی) و Ex vivo (برون تنی) 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

## کتابخانه نمایش فاژی

کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی (Ph.D.<sup>TM</sup>-7 Phage New England Display Peptide Library) از شرکت 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 (heptapeptide) در انتهای آمین Minor Coat (N-terminus) پروتئین پوششی غیر اصلی (Protein M13KE) موسوم به pIII در سطح فاژ نمایش می‌یابد [۱۷]. کتابخانه پپتیدی مورد اشاره، پنج ظرفیتی (Pentavalent) است؛ بدین معنا که هر پنج نسخه پروتئین III موجود در یک ویریون فاژی بالغ، پیوند همسانه‌سازی شده را در سطح خود نمایش می‌دهد. تعداد همسانه‌های فاژی موجود در این کتابخانه  $10^9 \times 10^6$  است که این تعداد تقریباً تمامی توالی‌های پپتیدی ممکن قابل ساخت از یک توالی هفت اسید‌آمینه‌ای تصادفی را در بر می‌گیرد. سویه باکتریایی که به عنوان میزبان برای تکثیر فاژهای کتابخانه استفاده شد ER2738 بود. این سویه مشتق از باکتری اشريشیا 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  $20$  میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی باکتری ER2738 که به مرحله رشد لگاریتمی (تصاعدی) رسیده،  $10^{10} \text{ pfu} \times 10^6$  فاژ افزوده شد و به مدت  $4/5$  ساعت در  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در انکوباتور همراه با تکان (Shake) قرار داده شد. برای رسوب ذرات فاژی، PEG8000-NaCl ( محلول  $20$  درصد حجمی وزنی Polyethylene Glycol در

بیوپینیگ 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 به دست 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) به عنوان رده سلولی هدف و از HF-SF-PI3 (فیروblast طبیعی انسانی)، AGS (آدنوکارسینومای معده انسانی)، KYSE-30 (کارسینومای سلول‌های سنگفرشی مری انسانی) و Huh-7 (کارسینومای کبد انسانی) به عنوان سلول‌های شاهد استفاده شد. رده‌های سلولی ذکر شده از بانک سلولی انتستیتو پاستور ایران خریداری شدند. برای کشت سلول‌های SW480، HF-SF-PI3، Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) از محیط AGS و Huh-7 از محیط AGS (Gibco) (Eagle's Medium، آمریکا) حاوی  $10$  درصد سرم Gibco (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco) گاوی (América)، پنی‌سیلین ( $100$  واحد/ میلی‌لیتر) و استرپتومایسین ( $100$  میکروگرم/ میلی‌لیتر) استفاده شد. برای کشت سلول‌های KYSE-30 از محیط RPMI-1640 (Gibco) حاوی سرم جنین گاوی، پنی‌سیلین و استرپتومایسین (با مقداری ذکر شده در بالا) استفاده شد. فلاسک‌های  $25$  سانتی‌متر مربعی حاوی سلول‌های کشت داده شده در انکوباتور مرتبط دارای دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد و  $5$  درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شد. سلول‌ها پس از افزایش تعداد و پر کردن قسمت EDTA- EDTA-  $0/25$  درصد (Trypsin- Ethylenediaminetetraacetic Acid) با استفاده از تریپسین  $0/2$  درصد پاساژ داده شدند.

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

برای انجام بیوپینیng و غربالگری کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی، از SW480 به عنوان سلول هدف و AGS- KYSE- 30 و Huh-7 و فیبروبلاست به عنوان سلول‌های شاهد برای حذف (Subtraction) فاژهای غیراختصاصی نسبت به سلول Subtractive هدف استفاده شد. این بیوپینیng منفی یا کاهشی (Biopanning) موجب حذف فاژهای نمایش دهنده پپتیدهای غیر اختصاصی از مجموعه پپتیدهای موجود در کتابخانه می‌شود. برای انجام هر دور بیوپینیng، تعداد ۶۰۰۰۰ 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 به مدت یک ساعت با محیط کشت فاقد سرم تیمار شدند. سپس بافر مسدود کننده (Blocking Buffer) (Blocking Buffer) یک درصد تهیه شده در PBS به چاهک‌ها اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. ۱۰ میکرولیتر از کتابخانه فاژی-7<sup>TM</sup> Ph.D.<sup>TM</sup> (دارای ۱۰<sup>۱۱</sup> ویریون فاژی) حل شده در بافر مسدود کننده به چاهک حاوی سلول‌های شاهد اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس محلول رویی که حاوی فاژهای متصل نشده به سلول‌های شاهد بود، برداشته شد و به چاهک حاوی سلول SW480 اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 (۰/۲۰ مول گلیسین / HCl, pH=۲/۲) به چاهک اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس از ۲ مولار برای

NaCl با غلضت 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 سانتریفوگر در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد. رسوب فاژی به مدت آمده در یک میلی لیتر محلول TBS (Tris ۱۵۰ میلی مولار (Buffered Saline) حاوی ۵۰ میلی مولار 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 ۴ درجه سانتی گراد یا منهای ۲۰ درجه سانتی گراد (با افزودن حجم برابر گلیسرول نگهداری شد [۱۷].

برای تعیین تیتر محلول‌های فاژی از تهیه رقت‌های سریال Blue-White و روش غربالگری پلاک‌های آبی-سفید (Serial Screening) استفاده شد. بدین‌منظور رقت‌های سریال (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 به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. این زمان به فاژها فرصت می‌دهد تا سلول‌های باکتریایی را مورد عفونت قرار دهند. ۳ میلی لیتر محیط Top Agar ذوب شده (قرار داده شده در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) به محلول حاوی باکتری و فاژ افزوده شد و سپس محلول فوق روی پلیت‌های LB-Tet حاوی Isopropyl-B-D- IPTG ۵-Bromo (AppliChem) (Thiogalactoside ۵-BrO<sub>2</sub>-D-galactoside) (Fermentas) (4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) پخش شد. پلیت‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 / میلی لیتر تعیین شد.

$$\frac{\text{ضریب رقت} \times \text{تعداد پلاک‌ها}}{\text{حجم برد شده روی پلیت (میکرولیتر)}} \times 1000$$

استفاده شد: دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشتگی DNA، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال (Annealing) آغازگرها به رشته‌الگو، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر (Extension). تکثیر نهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای مشاهده باند DNA مربوط به قطعه تکثیر شده، محصول PCR روی ژل آکارز یک درصد تحت الکتروفوروز در ولتاژ ۱۰۰ قرار گرفت. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برومايد (Ethidium Gel Documentation)، ژل مربوط در دستگاه (Bromide 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 که کننده پیتید نمایش یافته روی سطح فاژ

نوع آغازگر	توالی آغازگر
جلوبی	۵'-TTTAGTCCTCAAAGCCTCTG-۳'
برگشتی	۵'-CAAGCCCCAATAGGAACCC-۳'

## تخليص و تعين توالی محصول PCR

قطعات DNA تکثیر شده از تمامی ۲۸ پلاک، قبل از ارسال برای تعین 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 آکارز یک درصد حاوی چاهک‌های بزرگ برده شد. ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR در داخل چاهک‌های مزبور قرار داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه تحت ولتاژ ۱۰۰ الکتروفوروز 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 به دست آمد. میکروتیوب حاوی محصول PCR تخلیص شده برای تعیین توالی ارسال شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده که کننده پیتیدهای اختصاصی توسط شرکت Pioneer کره جنوبی انجام شد.

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 بیوپینینگ، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مجموع سه دور پینینگ منفی روی سلول‌های شاهد و سه دور غربالگری مثبت روی سلول‌های SW480 انجام گرفت.

## انجام Plaque-PCR برای تکثیر منطقه کد کننده پیتیدهای 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 تکثیر شده از ژنوم فاژ در برگیرنده توالی نوکلئوتیدی که کننده پیتید نمایش یافته روی سطح فاژ باشد. برای طراحی آغازگرهای جلویی (Forward Primer) و برگشتی (Reverse Primer)، ابتداء توالی ناقل فاژی از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank استخراج Oilgo و سپس طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار version 7 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 Amplicon Polymerase 2X Master Mix Red (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. Tag DNA Polymerase 2X Master Mix red، PCR ۱۰x، Amplicon Taq DNA Polymearse و dNTP و MgCl<sub>2</sub> (۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌مولار) است. پس از واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، برنامه زیر برای ۳۰ چرخه

## کتابخانه‌های فاژی و جداسازی پپتیدهای هدفمند کننده

دور بیوپینیگ، 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 ER2738 ۰/۲ مولار بازیابی شد و با استفاده از سویه باکتریایی تکثیر شد تا برای دور بعدی بیوپینیگ استفاده شود. برای حذف فاژهای غیراختصاصی از سلول‌های طبیعی فیروblast انسانی استفاده شد. فیروblast‌ها یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین سلول‌های بدن است و حضور آنها به عنوان 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 سلطانی AGS، Huh-7 و KYSE-30 روی Huh-7 نیز برای حذف فاژهای غیراختصاصی استفاده شد. در نهایت فاژهای بازیابی شده از دور سوم بیوپینیگ با سویه باکتریایی میزان آلوده شد و روی پلیت‌های IPTG-Xgal حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین برده شد. فاژهای مزبور به صورت پلاک‌های آبی در پلیت قابل مشاهده است (شکل ۱). با افزایش تعداد دورهای پینیگ، تعداد دفعات شستشو برای جداسازی فاژهای متصل نشده به سلول هدف نیز افزایش یافت. این امر موجب می‌شود تا تنها فاژهایی SW480 که از میل ترکیبی بالایی برای اتصال به سلول‌های برخوردار هستند، باقی بمانند و فاژهایی که اتصال آن‌ها به سلول هدف غیراختصاصی و با میل ترکیبی پایین است، طی مراحل مختلف شستشو از سلول هدف جدا شده و در نهایت از کتابخانه حذف شوند.

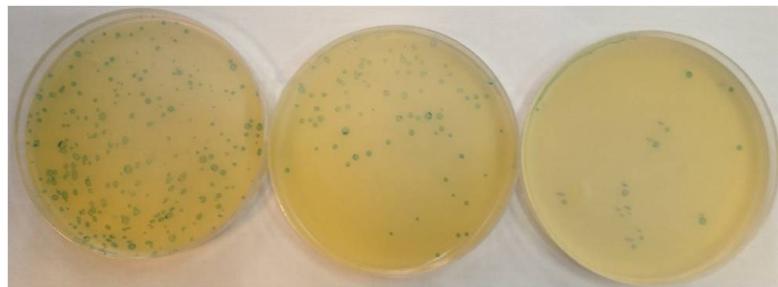
## شناسایی توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480 و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پپتیدهای به دست آمده

برای شناسایی توالی آمینواسیدی پپتیدهای به دست آمده از بیوپینیگ، 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 SAROTUP استفاده شد. همچنین از پایگاه اطلاعاتی 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

### بیوپینیگ برای جداسازی فاژهای متصل شونده به سلول SW480

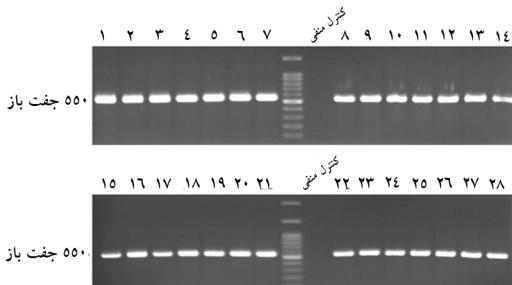
با انجام سه دور بیوپینیگ، در نهایت فاژهایی که واجد قابلیت اتصال به سلول‌های SW480 بود، جداسازی شد. در هر



شکل ۱ پلاک‌های آبی حاصل از تعیین تیتر محلول فاژی به دست آمده از دور آخر بیوپینیگ روی پلیت‌های حاوی IPTG-Xgal، پلیت‌های مختلف نشان دهنده رقت‌های مختلف محلول فاژی است.

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 به دست 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 به دست آمده از دور آخر بیوپینیng به دست آید. در جدول ۲ مشخصات پپتیدهای به دست آمده از بیوپینیng-توالی و فراوانی-نشان داده شده است. همسانه‌های فاژی به صورت PC1، PC2 و ... و پپتیدهای نمایش یافته روی این همسانه‌های فاژی به صورت SW-Pep2، SW-Pep1 و ... نام‌گذاری شدند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، بیوپینیng کتابخانه فاژی ۷<sup>TM</sup>-Ph.D. روی سلول SW480 و نیز رده‌های سلولی شاهد در نهایت منجر به جداسازی ۱۴ نوع توالی پپتیدی شد. پپتید ۱ از SW-Pep1 بالاترین فراوانی برخوردار بود و در مجموع ۸ همسانه فاژی جداسده با بیوپینیng این پپتید را نمایش می‌دادند. پپتید- SW-Pep2 با ۴ بار تکرار، پپتید ۳ 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 بیوپینیng تکرار نشده بودند. به طور کلی فراوانی بالاتر یک پپتید نشانگر غنی شدن (Enrichment) آن در حین انجام فرآیند بیوپینیng 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 ۱ 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

**Plaque-PCR** و تکثیر توالی نوکلئوتیدی کد SW480 کننده پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480 فرآیند تعیین تیتر چندین بار روی محلول به دست آمده از دور آخر بیوپینیng تکرار شد تا در نهایت پلیتی به دست 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 به دست 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 به دست آمده از دور آخر بیوپینیng است.

## به دست آوردن توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480

پس از دریافت نتایج تعیین توالی مربوط به ۲۸ پلاک به دست آمده از بیوپینیng، توالی پپتیدهای نمایش یافته روی فاژهای جدا شده به دست آمد. بدین منظور ژنوم فاژ

## کتابخانه‌های فاژی و جداسازی پپتیدهای هدفمند کننده

نمود که اختصاصیت و میل ترکیبی بالایی برای اتصال به سلول‌های SW480 دارند و بنابراین نمی‌توانند گزینه‌های مناسبی برای مطالعات بعدی محسوب شوند.

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

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

	درصد فراوانی	فراوانی	توالی اسید آمینه‌ای پپتید	نام پپتید	همسانه فاژی
۲۹	۸	<b>HAMRAQP</b>	SW-Pep1	PC-5, PC-9, PC-10, PC-11, PC-12, PC-15, PC-24, PC-28	
۱۴/۵	۴	<b>NAPDWPA</b>	SW-Pep2	PC-14, PC-18, PC-21, PC-27	
۱۱	۳	<b>SPSTHWK</b>	SW-Pep3	PC-1, PC-8, PC-25	
۷	۲	<b>STSFWIT</b>	SW-Pep4	PC-4, PC-7	
۷	۲	<b>NESH SRT</b>	SW-Pep5	PC-16, PC-26	
۳/۵	۱	<b>GFFHKTT</b>	SW-Pep6	PC-2	
۳/۵	۱	<b>LPAGRVL</b>	SW-Pep7	PC-3	
۳/۵	۱	<b>NGLTAWT</b>	SW-Pep8	PC-6	
۳/۵	۱	<b>AAPDWAG</b>	SW-Pep9	PC-13	
۳/۵	۱	<b>HAKRARA</b>	SW-Pep10	PC-17	
۳/۵	۱	<b>TLHPAAD</b>	SW-Pep11	PC-19	
۳/۵	۱	<b>HVQLWAT</b>	SW-Pep12	PC-20	
۳/۵	۱	<b>SAAIGTL</b>	SW-Pep13	PC-22	
۳/۵	۱	<b>LSNNNLR</b>	SW-Pep14	PC-23	

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 واحد موتیف- دو موتیف مهم در پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480 مشاهده شد؛ یکی موتیف چهار آمینواسیدی (Tetra Amino Acid Motif) APDW (Tetra Amino Acid Motif) 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

## تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی پپتیدهای متصل شونده به سلول SW480

انجام تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی روی پپتیدهای به دست 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 جداده و نیز بررسی اختصاصیت پپتیدهای مذبور در اتصال به سلول هدف (cell-specificity) انجام می‌شود.

برای پیدا کردن موتیف‌های مشترک بین پپتیدهای به دست 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 به دست آمده از کتابخانه‌های فاژی باید به دو ویژگی موتیف‌های مذبور

قبلاً در بیوپینیگ کتابخانه فاژی 7<sup>TM</sup> Ph.D. به ترتیب روی پلیمر اپوکسی [۲۱] و دی اکسید سیلیکون SiO<sub>2</sub> [۲۲] به دست آمده است. از آنجا که دو پپتید مزبور هم در غربالگری کتابخانه فاژی 7<sup>TM</sup> Ph.D. روی سلول‌های سرطانی روده و هم روی مولکول‌های ذکر شده در بالا جدا شده است، نمی‌توانند به طور اختصاصی به سلول‌های SW480 متصل شوند.

یکی از مشکلات غربالگری کتابخانه‌های فاژی پپتیدی، False Positive امکان جداسازی پپتیدهای مثبت کاذب (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 بیوپینیگ 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 بیوپینیگ 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 [۲۴]. بررسی توالی‌های پپتیدی حاصل از بیوپینیگ کتابخانه 7<sup>TM</sup> 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 به دست آمده است، جزء پپتیدهای TUP نیست. این امر بیانگر آنست که جداسازی این پپتیدها به علت آن میل SW480 ترکیبی بالا و اختصاصیت آنها در اتصال به سلول‌های است. البته دو پپتید SW-Pep11 و SW-Pep14 به علت آن که 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

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

جدول ۳ هم‌ردیغی توالی‌های پپتیدی به دست آمده از بیوپینیگ که نشان دهنده موتفی‌های آمینواسیدی مشترک بین پپتیدهای جدا شده است.

اسامی پپتیدها	توالی پپتیدها
HAMRAQP	SW-Pep1
HAKRARA	SW-Pep10
NAPDWPA	SW-Pep2
AAPDWAG	SW-Pep9
LPAGRVL	SW-Pep7
TLHPAAD	SW-Pep11
SAAIGTL	SW-Pep13
NGLTAWT	SW-Pep8
LSNNNLR	SW-Pep14
SPSTHWK	SW-Pep3
HVQLWAT	SW-Pep12
NESHSR	SW-Pep5
STSFWIT	SW-Pep4
GFFHKTT	SW-Pep6

برای بررسی این‌که پپتیدهای جدا شده در مطالعه حاضر جدید هستند یا قبل‌گزارش 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 به دست آمده از کتابخانه‌های فاژی پپتیدی است و در برگیرنده تمامی پپتیدهای به دست آمده از غربالگری کتابخانه‌های فاژی پپتیدی است که در مقالات گزارش شده‌است. همچنین در این پایگاه اطلاعات تکمیلی همچون عامل هدف استفاده در بیوپینیگ، نوع کتابخانه غربال شده و ... موجود است [۲۰].

بررسی توالی‌های پپتیدی به دست آمده از مطالعه حاضر با نرمافزار MimoDB نشان داد که از مجموع چهارده پپتید به دست آمده، دوازده پپتید جدید بوده و تاکنون در هیچ مطالعه‌ای که در آن‌ها از بیوپینیگ 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 SW-Pep14) و SW-Pep11 (با توالی LSNNNLR) (TLHPAAD)

## کتابخانه‌های فازی و جداسازی پیتیدهای هدفمند کننده

شونده به انواع سلول‌ها و بافت‌های هدف را فراهم می‌آورد. از کتابخانه‌های فازی پیتیدی که طیف وسیعی از پیتیدهای دارای ویژگی‌های اتصالی منحصر به فرد را نمایش می‌دهد، می‌توان برای جداسازی و انتخاب لیگاندهای پیتیدی با اختصاصیت (Selectivity) و میل ترکیبی (Affinity) بالا نسبت به انواع سلول‌های سرطانی استفاده نمود [۷]. بر همین اساس، تاکنون از غربالگری کتابخانه‌های نمایش فازی پیتیدی برای جداسازی و شناسایی پیتیدهای اختصاصی سلول‌های سرطانی بافت‌های مختلف استفاده شده است. یکی از مزایای استفاده از کتابخانه‌های فازی برای جداسازی لیگاندهای پیتیدی 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 پیتیدی-7 Ph.D.<sup>TM</sup>-7 برای جداسازی لیگاندهای پیتیدی اختصاصی سلول SW480 (سلول آدنوکارسینومای روده انسان) استفاده شد. در شیوه مورد استفاده در این تحقیق در هر دور غربالگری کتابخانه فازی، 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 فازی، تعداد دورهای بیوپنینگ مثبت و منفی با هم برابر نیست. در ضمن غربالگری‌های مثبت و منفی به صورت 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 به صورت همزمان در یک دور بیوپنینگ استفاده شد. این شیوه بیوپنینگ که در آن غربالگری‌های منفی و مثبت در تمامی دورهای بیوپنینگ و

نمی‌شوند، اما باید آن‌ها را از فهرست پیتیدهای 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 مولکولهای 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 Intestinal Mucosal و نفوذپذیری اندک مرز مخاطی روده (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 به طور 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 فازی 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

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

روشی که در این تحقیق برای غربالگری کتابخانه فازی استفاده شد، به صورت *In vitro* بود. بیوپینینگ به شیوه *In vitro* روی سلول‌های موجود در کشت سلول، روشی کارآمد است که در مقایسه با *In vivo Panning* از مزایایی برخوردار است. یکی از مشکلات *In vivo Panning* آنست که مویرگ‌های موجود در سیستم عروقی به عنوان مانع برای عبور فازها عمل می‌کند و بنابراین اغلب فازهای به دست آمده به جای اتصال به خود سلول‌های توموری موجود در بافت هدف به سلول‌های آندوتیال موجود در دیواره رگ‌های خونی بافت هدف متصل می‌شود. بر همین اساس، بسیاری از مطالعاتی که در آن‌ها از بیوپینینگ به شیوه *In vivo* استفاده شده منجر به جداسازی پیتیدهای اختصاصی سلول‌های آندوتیال شده‌است [۳۰]. نکته دیگری که در مطالعه کنونی احتمال جداسازی پیتیدهای با میل ترکیبی بیشتر و اختصاصی‌تر نسبت به سلول‌های SW480 را افزایش می‌دهد، نوع کتابخانه پیتیدی انتخاب شده است. کتابخانه ۷-<sup>TM</sup> Ph.D. که در این پژوهش استفاده شد، بر اساس ناقل فازی M13KE طراحی شده است. در این ناقل از pIII فازی برای نمایش پیتیدهای خارجی استفاده می‌شود. هر ناقل فازی دارای پنج نسخه از pIII است.

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

یکی از مهم‌ترین کاربردهای پیتیدهای به دست آمده در فرآیند بیوپینینگ، استفاده از آن‌ها برای رسانش هدفمند عوامل درمانی به سلول‌های توموری است. برای محقق شدن این هدف، پیتیدهای جداشده در غربالگری کتابخانه‌های فازی باید از قابلیت اتصال به سلول‌های توموری برخوردار باشند و در عین حال 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 بیوپینینگ منفی روی سلول‌های شاهد پیتیدهایی که قادر به اتصال به سلول‌های طبیعی و نیز سلول‌های سرطانی متعلق به بافت‌هایی غیر از روده بودند، از کتابخانه پیتیدی حذف شدند. در فرآیند بیوپینینگ، جداسازی پیتیدهای اختصاصی براساس ویژگی‌ها و مشخصات سطحی سلول‌ها صورت می‌گیرد. دو رده سلولی AGS و KYSE-30 که جزء سلول‌های شاهد مورد استفاده بودند، به ترتیب 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 بیوپینینگ منفی موجب می‌شود تا در نهایت پیتیدهایی انتخاب شود که تمایلی برای اتصال به دیگر سلول‌های دستگاه گوارش نداشته باشد. این امر موجب افزایش قابلیت پیتیدهای جداشده برای کاربردهای *In vivo* می‌شود. همچنین گزارش شده که بافت کبد تمایل به جذب غیراختصاصی فازهای *In vivo* دارد. علت این امر وجود سیستم ریکولوآندوتیال (Reticuloendothelial System) در این بافت است [۲۹].

## کتابخانه‌های فازی و جداسازی پپتیدهای هدفمند کننده

که پروتکل بیوپینیگ مورد استفاده منجر به جداسازی پپتیدهایی شده که از قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطان کولون برخوردار هستند. در بین پپتیدهای به دست آمده، پپتید-SW<sup>-1</sup> Pep1 به دلیل فروانی بالاتر و غنی‌سازی کارآمدتر در فرآیند بیوپینیگ می‌تواند لیگاند اختصاصی مناسبی برای اتصال به سلول‌های سرطان کولون باشد. این امر نشان می‌دهد پپتید-SW<sup>-1</sup> Pep1 از این مزیت برخودار است که به عنوان 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 زنگرفت (Xenograft).

## 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. نویسنده‌گان مقاله مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از کلیه دانشجویان گروه ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می‌دارند.

بنابراین هر ذره فازی حاوی پنج نسخه نمایش یافته از هر پپتید است [۱۷]. برخی موقع برای طراحی سیستم‌های نمایش فازی از pVIII فازی استفاده می‌شود که تقریباً ۳۰۰۰-۲۷۰۰ نسخه از آن روی هر فاز وجود دارد. وقتی از pVIII برای نمایش پپتیدها استفاده می‌شود، تعداد نسخه‌های بسیار بیشتری از پپتید مربوط روی سطح فاز 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 فازی موجب می‌شود که غربالگری سیستم Ph.D.<sup>TM-7</sup> 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 فازی وجود دارد [۳۱]، توالی‌های پپتیدی به دست آمده از TUP طریق پایگاه SAROTUP بررسی شد. وجود پپتیدهای 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 به دست 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

## 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:

- 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.
- [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.<sup>TM</sup>-7 Phage Display Peptide Library Instruction Manual. Available at [www.neb.com/products/e8102-phd-7-phage-display-peptide-library](http://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

- 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<sup>1</sup>, 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.