

Identification of Novel Targeting Peptides for PC3 Cells by the Screening of a Phage Display Peptide Library

Saeedeh Ghiasvand¹, Fatemeh Rahbarizadeh², Majid Sadeghizadeh^{3*}

1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, 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: 24/Dec/2014, Accepted: 14/Jan/2015

Abstract

Objective: Prostate cancer is the second cause of cancer-associated death in men. In recent years, targeted therapy for cancer has attracted the attention of researchers. Targeted therapy leads to a decrease in drug adverse effects. Studies indicate that targeting peptides for cancer cells represent valuable tools for diagnostics and therapeutics. Recently, phage display peptide libraries have been used to identify target peptides to a variety of cancer cells. In the current study, we aim to isolate peptides that target PC3 cells (human prostate adenocarcinoma cells).

Methods: Four rounds of subtractive panning on control cells that included 5637 (bladder), Huh-7 (liver), SW480 (colon), AGS (stomach) and human fibroblast normal in addition to four rounds of positive panning on PC3 (target cell) were performed. Polyclonal phage ELISA was used to evaluate the process of enrichment during biopanning. Subsequently, phage clones were randomly selected from titer plates, amplified by plaque-PCR, and their genomic DNA was sequenced. We conducted bioinformatic analysis for further characterization of the isolated peptides.

Results: Several rounds of panning resulted in the enrichment of a number of peptides. The results of polyclonal phage ELISA indicated that the biopanning process was successful. In silico analysis showed the presence of several consensus amino acid motifs in the peptides.

Conclusion: The peptides identified through biopanning can be considered as potential specific binders to PC3 cells. Peptides with specificity binding to target cells can be used for targeted gene and drug delivery to malignant tumor cells. Further analyses of these peptides are required to show their capacity for targeted delivery of various genes and drugs into prostate cancer cells.

Keywords: Phage peptide library, Biopanning, Targeting peptide, Prostate cancer

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 2, Pages: 69-83

شناسایی پپتیدهای جدید هدف‌گیری کننده سلول‌های آدنوکارسینومای پروستات (PC3 Cell line) با استفاده از کتابخانه نمایش فاژی پتیدی

سعیده قیاسوند^۱، فاطمه رهبری زاده^۲، مجید صادقی زاده^{۳*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: sadeghma@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۰۳

پذیرش مقاله: ۹۳/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: سرطان پروستات دومین سرطان مرگ آور پس از سرطان ریه در مردان است. در سال‌های اخیر درمان هدفمند سرطان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این امر موجب می‌شود عوارض جانبی ناشی از مصرف دارو به حداقل برسد. مطالعات نشان داده است که پپتیدهای هدف‌گیری کننده سلول‌های سرطان قابلیت استفاده به‌عنوان ابزارهای درمانی و تشخیصی هدفمند را دارند. اخیراً کتابخانه‌های نمایش فاژی پتیدی برای شناسایی پپتیدهای هدف‌گیری کننده به‌کار گرفته شده است. هدف از این تحقیق جداسازی پپتیدهای هدف‌گیری کننده سلول‌های PC3 به‌عنوان نشانگری هدفمند برای شناسایی سرطان پروستات بود.

مواد و روش‌ها: ۴ دور غنی‌سازی مثبت روی سلول‌های PC3 (سلول هدف) و ۴ دور غنی‌سازی منفی روی سلول‌های کنترل شامل فیروبیلاست، AGS، SW480، 5637 و Huh-7 انجام شد. پلی‌کلونال فاز الایزا برای ارزیابی روند غنی‌سازی انجام شد. سپس ژنوم تعدادی از فازهای جداسازی شده در مراحل آخر غنی‌سازی با انجام PCR روی پلاک‌های به‌دست آمده، تکثیر و تعیین توالی شد. مطالعات بیوانفورماتیکی برای بررسی‌های بیشتر انجام شد.

نتایج: چندین دور غنی‌سازی کتابخانه فاژی منجر به غنی‌سازی تعدادی پپتید شد. نتایج پلی‌کلونال فاز الایزا موفقیت‌آمیز بودن روند غنی‌سازی را تأیید کرد. همچنین بررسی‌های بیوانفورماتیکی توالی‌های به‌دست آمده چند دنباله آمینواسیدی مشترک را نشان داد.

نتیجه‌گیری: پپتیدهای جداسازی شده طی فرآیند غنی‌سازی را می‌توان نشانگری اختصاصی برای سلول‌های سرطانی پروستات PC3 در نظر گرفت. توالی‌های پتیدی با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول هدف را می‌توان برای هدایت هدفمند ژن و دارو به سلول‌های بدخیم پروستات استفاده نمود. تحقیقات بیشتری برای بررسی قابلیت ورود هدفمند این پپتیدها برای انتقال دارو یا ژن‌های سرکوبگر تومور به داخل سلول‌های سرطانی پروستات باید انجام شود.

کلیدواژگان: کتابخانه نمایش فاژی، غنی‌سازی، پپتیدهای هدف‌گیری کننده، سرطان پروستات

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، صفحات: ۶۹-۸۳

مقدمه

پروستات به شکل غده‌ای کوچک در زیر مثانه و در بالای مجرای ادراری قرار گرفته است. در کشورهای توسعه یافته سرطان پروستات دومین سرطان رایج پس از سرطان پوست و دومین سرطان مرگ آور پس از سرطان ریه در مردان است. از

جداسازی پپتیدهای هدفگیری کننده سلول PC3

نشاندگری اختصاصی برای سرطان پروستات محسوب نمی‌شود. زیرا در حالت طبیعی با افزایش سن میزان PSA طبیعی در مردان افزایش می‌یابد. همچنین همان‌طور که قبلاً هم ذکر شد در عفونت پروستات، خوش‌خیمی پروستات، در انزال و در ناراحتی‌های روانی و خشم میزان PSA افزایش می‌یابد [۶-۸]. که می‌تواند موجب نتیجه تشخیصی مثبت کاذب (False positive) شود. برعکس در برخی افراد مبتلا به سرطان پروستات دیده شده است که سطح PSA نسبت به افراد طبیعی تغییر نیافته یا حتی کاهش یافته است که این امر آزمون‌های تشخیص سرطان بر اساس اندازه PSA را دچار مشکل می‌کند و باعث نتیجه منفی کاذب (False negative) می‌شود [۹].

به طور کلی در حال حاضر، جراحی، رادیوتراپی، شیمی درمانی و هورمون درمانی به عنوان روش‌های اصلی برای درمان سرطان پروستات محسوب می‌شوند که متأسفانه هیچ یک از این روش‌های درمانی قابلیت درمانی صد درصد ندارد. بنابراین یافتن شیوه‌های درمانی جدید خصوصاً استراتژی‌های برای هدفمند نمودن درمان سرطان پروستات که موجب افزایش کارایی روش‌های درمانی و کاهش عوارض جانبی ناشی از روش‌های درمانی غیر اختصاصی می‌شود ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون نشانگرهای ایده‌آلی برای سرطان پروستات و اهداف آن برای رسانش هدفمند داروها شناسایی نشده است. داروهای پپتیدی به علت اندازه کوچک و قابلیت نفوذ بالا به بافت‌ها، ایمنی‌زایی کم گزینه‌های مناسبی در زمینه فارماکولوژی محسوب می‌شود. اتصال این ذرات پپتیدی به داروهای ضد سرطانی موجب افزایش اختصاصیت در رسانش دارو به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی و در نتیجه اختصاصیت درمان می‌شود [۱۰-۱۳].

در سال‌های اخیر درمان هدفمند (Targeted therapy) سرطان بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هدف این شیوه درمانی آن است که داروی مورد استفاده تنها وارد سلول‌های سرطانی شده و بافت‌های سالم را تحت تأثیر قرار ندهد. این امر موجب می‌شود عوارض جانبی (Side effects) ناشی از

هر شش مرد یک نفر به این سرطان مبتلا می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژی نشان داده است که عامل‌های توارثی در بروز ۱۰ درصد از این بیماری نقش دارد [۱، ۲]. بیشترین فراوانی سرطان پروستات در آفریقا و کمترین میزان شیوع آن در آسیا مشاهده می‌شود. اکثر تومورهای پروستات آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) هستند که خصوصیات مشترک زیادی با سرطان‌های رایج اپیتلیال مانند سرطان پستان و روده دارند [۳]. سرطان پروستات به عنوان دومین علت شایع مرگ و میر در اثر سرطان در مردان یک مسئله مهم به شمار می‌رود. مطالعه مربوط به نخستین گزارش شیوع سرطان در تهران سرطان پروستات را دومین سرطان شایع در مردان معرفی می‌کند [۴]. اولین راه برای تشخیص سرطان پروستات معاینه غده پروستات توسط معاینه انگشتی رکوم (Digital rectal examination) از الگوهای غربالگری سرطان پروستات است. در این روش پزشک از طریق مقعد، غده پروستات را معاینه می‌کند، وجود سطح خشن و نامنظم بافت از علایم هشدار دهنده سرطان پروستات محسوب می‌شود. تومورهای سرطان پروستات پادگن‌های مشخصی را تولید می‌کند که ممکن است با آزمایش خون کشف شود. در حال حاضر تشخیص بر پایه آزمون‌های هیستوپاتولوژیکی یا نمونه‌های سیتولوژی از غده پروستات است [۵]. جدی‌ترین عارضه پس از بیوپسی از پروستات عفونت (Sepsis) است. تشخیص سریع سرطان پروستات با اندازه‌گیری آنتی‌ژن ویژه پروستات (Prostate Specific Antigen: PSA) از آزمایش‌های غربالگری این بیماری است. در بیمارانی که به سرطان پروستات مبتلا هستند مقدار این آنتی‌ژن در سطح بالاتری است. شایان ذکر است که تنها سطح بالای PSA در آزمایش خون فرد، نمایانگر ابتلا به سرطان پروستات نیست. در برخی از موارد عفونت یا بزرگی خوش‌خیم حجم غده پروستات می‌تواند سبب افزایش PSA در خون شود. ترکیب معاینه مقعد توام با تعیین سطح PSA خون روش دقیق‌تری برای تشخیص سرطان پروستات است. نتایج مطالعات اخیر نشان داده است که افزایش میزان PSA

مصرف دارو به حداقل برسد. عمده روش‌هایی که در حال حاضر برای درمان سرطان استفاده می‌شود، هدفمند نیست و بر همین اساس کاربرد آن‌ها موجب بروز مشکلات بسیار زیادی برای بیماران مبتلا می‌شود. این مسئله بیانگر اهمیت "رسانش هدفمند وابسته به لیگاند" (Ligand-mediated targeted delivery) داروها به سلول‌های سرطانی است؛ هدفی که در صورت تحقق آن شاهد پیشرفت چشمگیر و قابل توجهی در افزایش کارآمدی داروهای مورد استفاده برای درمان سرطان خواهیم بود [۱۴].

داروهای پتیدی به علت اندازه کوچک و قابلیت نفوذ بالا به بافت‌ها و ایمنی‌زایی کم گزینه‌های مناسبی در زمینه فارماکولوژی محسوب می‌شود. اتصال این ذرات پتیدی به داروهای ضد سرطانی موجب افزایش اختصاصیت در رسانش دارو به سلول‌ها و بافت‌های سرطانی و در نتیجه اختصاصیت درمان می‌شود [۱۰، ۱۱].

کتابخانه‌های نمایش فاژی از جمله ابزارهایی است که برای شناسایی پپتیدهایی که بافت‌ها، تومورها یا پروتئین‌های خاصی را مورد هدف قرار می‌دهند به کار گرفته شده‌است. این کتابخانه‌ها ابزارهایی برای غربالگری و شناسایی مولکول‌های دارویی محسوب می‌شود. کتابخانه نمایش فاژی پتیدی یکی از پرکاربردترین کتابخانه‌های نمایش فاژی است و نسبت به سایر کتابخانه‌های فاژی ایمنی‌زایی کمتر و قابلیت نفوذ بیشتری دارد. در این کتابخانه‌ها انواع بسیار زیادی از پپتیدهای با توالی تصادفی به صورت متصل شده با پروتئین پوششی فاژ در سطح فاژ نمایش داده می‌شود. در این کتابخانه‌ها هرکلون فاژی بیان کننده یک نوع توالی آمینواسیدی منحصر به خود است که در مجموع میلیاردها نوع پپتید در سطح فاژهای یک کتابخانه نمایش داده می‌شود [۱۲، ۱۳].

نمایش فاژی روشی مولکولی است که در این روش ژن‌ها به صورت فرم عملکردی در سطح خارجی باکتریوفاژ از طریق اتصال با پروتئین‌های پوششی ویروس نمایش داده می‌شود. از مزایای روش نمایش فاژی، شناسایی سریع و جداسازی فاژهای

دارای اختصاصیت اتصال به هدف مورد مطالعه طی فرآیندی به نام غنی‌سازی (Biopanning) است. غنی‌سازی امکان شناسایی پپتیدهای اختصاصی در محدوده میکرومولار تا نانومولار را موجب می‌شود [۱۵، ۱۶]. طی غنی‌سازی فاژهای کتابخانه ابتدا با هدف مورد نظر که می‌تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت یا موجود زنده باشد انکوبه می‌شود. سپس فاژهای اتصال نیافته طی مراحل شستشو حذف و فاژهای اتصال یافته پس از مرحله رهاسازی در میزبان مناسب تکثیر می‌یابند. معمولاً ۳ تا ۵ دور از فرآیند غنی‌سازی برای به دست آوردن فاژهای اختصاصی ضروری است. توالی پپتیدها از طریق تعیین توالی DNA هر کلون تعیین می‌شود [۱۷-۱۹]. فرآیند غنی‌سازی روی سلول‌های سرطانی منجر به جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی می‌شود.

این مطالعه شناسایی و جداسازی فاژ یا فاژهایی از یک کتابخانه فاژی که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول PC3 به عنوان سلول توموری پروستات را داشته باشند را بررسی می‌کند. به همین منظور، با استفاده از کتابخانه فاژی هفت پتیدی طی مراحل غنی‌سازی متعددی فاژهایی که به طور اختصاصی به سلول PC3 نسبت به رده‌های سلولی کنترل متصل می‌شود جداسازی و در میزبان مناسب تکثیر و سپس با تعیین توالی شناسایی شد. در نهایت با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی مطالعات بیشتری روی توالی‌های پتیدی جدا شده انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر پایه تحقیقات آزمایشگاهی و مطالعات بیوانفورماتیک است. در مرحله اول توسط تحقیقات آزمایشگاهی فاژهای که قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی پروستات را دارند، غنی‌سازی و در مرحله بعد با مطالعات بیوانفورماتیک بررسی شدند.

کتابخانه نمایش فاژی و سویه باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق کتابخانه نمایش فاژی پتیدی و در واقع مجموعه‌ای

جداسازی پپتیدهای هدفگیری کننده سلول PC3

گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و یک درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین (PenSterp) و در شرایط انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵ درصد رشد داده شدند. سلول‌ها پس از گذشت سه روز با استفاده از تریپسین (Trypsin) ۲۵/ درصد، EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۲ درصد پاساژ داده شدند. تمامی مواد کشت سلول از شرکت Gibco آمریکا خریداری شد.

غنی سازی کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی

فاژهای متصل شونده به رده سلولی PC3

غنی سازی مهم ترین مرحله شناسایی ذرات فاژی هدفمند با استفاده از روش نمایش فاژی است. انجام مراحل متعدد غنی سازی و شستشوی با افزایش زمان و حجم می تواند منجر به جداسازی ذرات فاژی با میل پیوندی بالا شود. برای انجام مرحله اول غنی سازی، سلول‌ها یک روز قبل از غنی سازی تریپسینه و تعداد ۳×۱۰^۵ از سلول‌های کنترل (تعداد مساوی "۶۰ هزار" از هر رده سلول به صورت مخلوط در یک چاهک) و تعداد ۳×۱۰^۵ از سلول‌های PC3 در پلیت‌های ۶ خانه ریخته شدند. در روز بعد محیط سلول‌ها (که تراکم حدود ۹۰ درصد داشت) با محیط فاقد سرم تعویض و یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پس از آن به مدت ۱ ساعت با بافر مسدود کننده PBS+BSA2% در دمای اتاق مسدود شدند. بعد از حذف بافر مسدود کننده یک بار با بافر شستشو (PBS+BSA 1%) شسته و ذرات فاژی به تعداد pfu ۱×۱۰^{۱۱} به سلول‌های کنترل اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت ذرات فاژی که قادر به اتصال به سلول‌های کنترل نبود و در سوسپانسیون رویی قرار داشت با سمپلر از سطح چاهک‌های سلول کنترل جمع آوری و به سلول‌های PC3 اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ذرات فاژی که اتصال ضعیف داشت طی شستشو با PBS+BSA1% حذف شد و فاژهای اتصال یافته طی فرایند لیز سلولی و با افزودن ۰/۸ میلی لیتر تری اتیل آمین و انکوباسیون به مدت ۸

از فاژهایی است که در سطح فاژ (در پایانه N ژن PIII) پپتیدهای متنوعی بیان می شوند در حالی که DNA مربوط به این قطعات در داخل ژنوم قرار دارد، که این یک ارتباط فیزیکی بین پپتید بیان شده و DNA کد کننده آن به وجود می آورد. امروزه کتابخانه‌های فاژی به صورت تجاری و در انواع مختلفی وجود دارد. در این مطالعه کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی (Ph.D.-7 phage display peptide library) از شرکت New England BioLabs (آمریکا) خریداری شد. این کتابخانه از ناقل فاژی M13KE ساخته شده است. توالی‌های پپتیدی تصادفی هفت اسید آمینه‌ای که در انتهای آمین پروتئین پوششی pIII کلون شده‌اند پس از بیان در سطح فاژ نمایش داده می شوند. کتابخانه‌هایی که با استفاده از فاژ M13KE ساخته شده است، پنج ظرفیتی است و هر پنج نسخه پروتئین III موجود در یک ویرون فاژی بالغ، پپتید کلون شده را در سطح خود نمایش می دهد. از غربالگری این کتابخانه نمایش فاژی برای جداسازی پپتیدهای با قابلیت اتصال اختصاصی به سلول‌های سرطانی پروستات PC3 استفاده شد. سویه باکتریایی که به عنوان میزبان برای تکثیر فاژهای کتابخانه در مراحل مختلف تحقیق استفاده شد، ER2738 بود. این سویه از باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، دارای پیپلوس جنسی (F⁺) است و از سرعت رشد بسیار بالایی برخوردار است [۲۰].

کشت رده‌های سلولی

رده‌های سلولی 5637 (آدنوکارسینومای مثانه)، AGS (آدنوکارسینومای معده)، SW480 (آدنوکارسینومای کلون)، HUH7 (کارسینومای کبد) و فیبروبلاست (Fibroblast) به عنوان سلول‌های کنترل و PC3 (آدنوکارسینومای پروستات) به عنوان سلول هدف از بانک سلولی انیستیتو پاستور خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Roswell Park) و DMEM (Memorial Institute medium) (Dulbecco's) و modified Eagle's medium (حاوی ده درصد سرم جنین

دقیقه و سپس اضافه کردن ۰/۸ میلی لیتر، TRIS /HCL ۱ مولار pH=۷/۴ استخراج شد؛ سپس ذرات فازای تیترو و تکثیر شد. فازهای تکثیر شده برای انجام دور بعدی غنی سازی مطابق با روش انجام شده در دور اول استفاده شد. به همین ترتیب دورهای بعدی غنی سازی انجام شد با این تفاوت که در دورهای بعدی تعداد و زمان مراحل شستشو افزایش یافت.

تیتراسیون فازها

برای تخمین اولیه از تعداد فازهای تکثیر یافته رقت سریالی از سوسپانسیون فازای تهیه شد. و هر رقت فاز به ۲۰۰ میکرولیتر باکتری ER2738 با جذب نوری مناسب در هر تیوب جداگانه اضافه شد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا زمان مناسب برای آلودگی باکتری ها با فازها فراهم شود. پس از آن با افزودن ۲ میلی لیتر TOP آگاری که از قبل در ماکروویو ذوب شده بود و دمای آن تقریباً ۴۵ درجه سانتی گراد بود، مخلوط و روی پلیت های LB (Luria Bertani) جامد حاوی آنتی بیوتیک تتراسیکلین و IPTG/XGAL که یک ساعت قبل از تیتراسیون در انکوباتور گرم شده بود به طور یکنواخت پخش شد. تیترو محلول فازای با شمارش پلاک های آبی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مشخص شد.

آزمون پلی کلونال فاز الایزا

برای بررسی روند غنی سازی، تعداد ۲۰ هزار از سلول های PC3 در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. روز بعد پس از مسدود نمودن چاهک ها با بافر مسدود کننده (2% PBS/BSA)، ذرات فازای مراحل مختلف غنی سازی به تعداد یکسان (10^{11} Pfu) به هر چاهک افزوده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون با تکان دادن و ۳۰ دقیقه انکوباسیون بدون تکان دادن امکان اتصال ذرات فازای فراهم شد. در مرحله بعد فازهای با اتصال ضعیف و غیر اختصاصی طی مرحله شستشو حذف شد. سپس آنتی بادی Anti-M13

متصل به HRP (Horseradish peroxidase) اضافه و در نهایت با افزودن TMB (Tetramethylbenzidine) متوقف نمودن واکنش با اسید سولفوریک ۱۲ نرمال واکنش متوقف و با دستگاه خواننده الایزا جذب در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

تکثیر و استخراج فاز

برای تکثیر فازها کشت شبانه باکتری ER2738 به نسبت ۱ به ۱۰۰ در LB رقیق شد و به ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت حاوی باکتری ER2738 در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری اضافه شد. پس از مدتی انکوباسیون زمانی که به مرحله رشد لگاریتمی (تصادفی) رسید، 1×10^{11} pfu فاز افزوده شد و به مدت ۴/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور همراه با تکان (shake) قرار داده شد. ذرات باکتری با سانتریفوژ در ۳۷۵۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد و محلول رویی که حاوی ذرات فازای است به فالکن جدید منتقل شد. برای رسوب ذرات فازای، PEG8000-NaCl (محلول ۲۰ درصد حجمی وزنی پلی اتیلن گلیکول در NaCl با غلظت ۲/۵ مولار) به میزان ۱/۶ حجم به محلول حاوی باکتری و فاز اضافه شد و سپس ۲ ساعت روی یخ قرار داده شد. ذرات فازای با سانتریفوژ در ۱۸۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد. رسوب فازای به دست آمده در یک میلی لیتر محلول TBS (Tris Buffered Saline) حاوی ۱۵۰ میلی مول NaCl و ۵۰ میلی مول Tris با pH=۷/۵ حل شد. این کار دو بار تکرار می شود تا در نهایت تمامی سلول های باکتریایی و اجزا باقیمانده آن ها حذف شده و تمامی ذرات فازای موجود در محلول رسوب کند. رسوب رادر ۵۰۰ میکرولیتر TBS بافر حل شد. این رسوب حاوی ذرات فازای است که برای مراحل بعد (تیتراسیون و تعیین توالی) استفاده شد. در نهایت، فازهای تکثیر شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد یا ۲۰- درجه سانتی گراد (با افزودن حجم برابر گلیسرول) نگهداری شد [۲۰].

شد. پپتیدهای به دست آمده با نرم افزار clustal W به منظور تعیین درصد هم ردیفی و همولوژی پپتیدها بررسی شد.

نتایج

غنی سازی بر روی سلول PC3

مراحل غنی سازی، با انجام چهار دور روی سلول های مورد مطالعه انجام شد. در نهایت فازهایی که واجد قابلیت اتصال به سلول PC3 به عنوان سلول های هدف مورد مطالعه بود، جداسازی شد. حذف پپتیدهای غیر اختصاصی از نکات مهم در غنی سازی است. منظور از پپتیدهای غیر اختصاصی، پپتیدهایی است که می تواند به سلول هایی غیر از سلول هدف اتصال پیدا کند. بنابراین حذف فازهای نمایش دهنده پپتیدهای متصل شونده به رده های سلولی دیگر غیر از سلول های پروستات مورد توجه قرار گرفت. به همین منظور غنی سازی منفی برای حذف فازهای نمایش دهنده پپتیدهای غیر اختصاصی روی رده های سلولی SW480، AGS، 5637، HUH7 و فیبروبلاست به عنوان سلول های کنترل انجام شد و غنی سازی مثبت برای جداسازی فازهای نمایش دهنده پپتیدهای اختصاصی برای سلول PC3 و به عنوان سلول هدف انجام شد. برای یافتن بهترین کلونی 4 بار غنی سازی تکرار شد و در هر تکرار برای افزایش اختصاصیت، افزایش سختی شرایط غنی سازی به صورت افزایش تعداد و زمان مراحل شستشو انجام شد. این امر موجب می شود که فازهای دارای میل ترکیبی بالاتر برای اتصال به سلول های هدف (PC3) باقی بماند و تعدادشان نسبت به فازهای با اتصال ضعیف تر و میل ترکیبی کمتر که طی شستشو حذف می شود، افزایش یابد.

ارزیابی روند غنی سازی با استفاده از تیتراسیون

ذرات فازی قبل و بعد از غنی سازی

برای ارزیابی چگونگی غنی سازی پس از هر دور تعداد

تکثیر DNA فازی، استخراج DNA از ژل و

تعیین توالی

محصول فازی به دست آمده در مرحله بالا به عنوان الگو برای تکثیر ژن PIII فاز که توالی پپتیدی در ناحیه پایانه N این ژن کلون شده است استفاده شد. واکنش پلیمرز زنجیره ای با استفاده از Master mix و آغازگرهای اختصاصی ژن PIII فاز M13 انجام گرفت. بدین منظور توالی رونوشت ژن مورد نظر از پایگاه اینترنتی NCBI دریافت و آغازگرهای الیگونوکلوئوتیدی مستقیم (Forward primer) و معکوس (Reverse primer) توسط نرم افزار primer express 3 و Oilgo v.7 طراحی شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ خلاصه شده است. واکنش PCR در ۳۵ چرخه انجام شد و مراحل دمایی و زمانی برای واسرشتگی اولیه، واسرشتگی و اتصال آغازگرها و گسترش به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بهینه شد. کارآیی تکثیر با ژل الکتروفورز بررسی شد. محصول PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل (AITbiotech، GeneAll® DNA Purification، کره جنوبی) خالص سازی شد و تخلیص DNA از ژل مطابق دستور کیت انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با نانودراپ و ژل آگارز بررسی شد و نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت (Bioneer، کره جنوبی) فرستاده شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر منطقه ژنومی فاز M13KE حاوی توالی نوکلئوتیدی کدکننده پپتید نمایش یافته روی سطح فاز

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

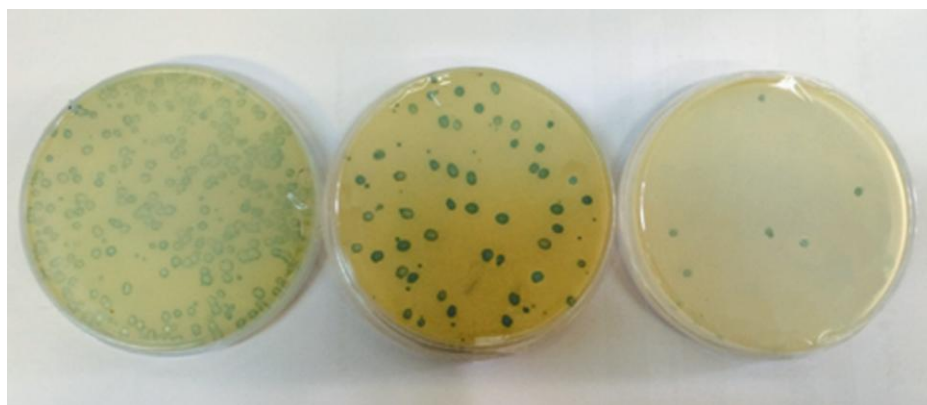
تجزیه و تحلیل توالی های به دست آمده

توالی های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی توسط نرم افزار آنالاین Transeq - Emboss به توالی پپتیدی ترجمه

ذرات فاژی قبل و بعد از غنی سازی محاسبه شد. افزایش تعداد فاژ بعد از هر مرحله در مقایسه با نتیجه غنی سازی قبلی دال بر موفقیت در انجام غنی سازی بود. بدین منظور از سوسپانسیون فاژی به دست آمده در انتهای هر دور غنی سازی، رقت های سریال تهیه شده و سویه باکتریایی ER2738 با رقت های تهیه شده از فاژ آلوده شدند. سپس رقت های فاژی بر روی

پلیت های IPTG-Xgal حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین برده شد. فاژهای بازیابی شده به صورت پلاک های آبی در پلیت قبل مشاهده است (شکل ۱).

نسبت فاژهای ورودی و خروجی در هر مرحله از غنی سازی برای تعیین کارایی غنی سازی استفاده شد. این نسبت ها در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱ تعیین تیتراژهای بازیابی شده پس از هر دور غنی سازی؛ انتقال رقت های مختلف سوسپانسیون فاژی به دست آمده پس از هر دور غنی سازی روی پلیت های IPTG-Xgal موجب پیدایش پلاک های آبی رنگ می شود. با افزایش رقت سوسپانسیون فاژی تعداد پلاک های ظاهر شده روی پلیت های IPTG-Xgal کاهش می یابد.

جدول ۲ نشان دهنده چگونگی روند غنی سازی است.

PC3			
کارایی بازیافت (Recovery efficiency)	تیتراژ خروجی** (Pfu)	تیتراژ ورودی* (Pfu)	
$1/6 \times 10^{-6}$	$1/6 \times 10^5$	1×10^{11}	دور اول
$9/4 \times 10^{-6}$	$9/4 \times 10^5$	1×10^{11}	دور دوم
$7/2 \times 10^{-5}$	$7/2 \times 10^6$	1×10^{11}	دور سوم
$1/3 \times 10^{-4}$	$1/3 \times 10^7$	1×10^{11}	دور چهارم

*: تعداد فاژ اولیه (Input)، **: تعداد فاژ خروجی (Output)

پلی کلونال فاژ الایزا برای تأیید موفقیت آمیز بودن روند غنی سازی

علاوه بر مقایسه تیتراژها قبل و بعد از غنی سازی، به منظور بررسی چگونگی روند غنی سازی فاژ الایزا انجام شد. فاژهای جداسازی شده در هر مرحله غنی سازی در باکتری ER2738 تکثیر و استخراج شد و تیتراسیون برای تعیین رقت

فاژها انجام شد. سلول های PC3 ترپسینه با تعداد ۲۰ هزار در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. فاژهای هر دور غنی سازی به رقت 10^1 pfu به صورت جداگانه به همه سلول ها اضافه شد و قابلیت اتصال فاژهای مراحل مختلف غنی سازی به سلول های PC3 طی واکنش الایزا بررسی شد. افزایش شدت جذب در سلول PC3 در آزمون الایزا انجام شده موفقیت غنی سازی روی این سلول ها را تأیید نمود (شکل

جداسازی پپتیدهای هدفگیری کننده سلول PC3

فاژ M13 انجام شد و قطعه ۵۵۰ نوکلئوتیدی حاوی ژن پوششی شماره ۳ فاژ و ۲۱ نوکلئوتید کلون شده در آن تکثیر شد. نتیجه تکثیر ژن روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳). پس از استخراج از ژل با استفاده از کیت Gene All نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) فرستاده شد.

نتیجه تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی

از مقایسه و هم‌ردیفی بین توالی ژنوم فاژ M13KE و توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی پلاک‌های انتخاب شده توالی‌های نوکلئوتیدی کدکننده پپتیدهای فیوز شده به ژن شماره III فاژ M13KE را مشخص شد. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی کلون شده در پایانه N ژن شماره III فاژ توسط پایگاه اینترنتی <http://web.expasy.org/translate/expasy> به توالی پپتیدی ترجمه شد. در نهایت توالی آمینواسیدی پپتیدهای نمایش یافته روی فازهای حاصل از غربالگری روی سلول‌های مورد مطالعه به دست آمد. توالی‌های پپتیدی به دست آمده در جدول ۳ قابل مشاهده است. در این جدول توالی پپتیدی و فراوانی هر یک از کلون‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که قابل ملاحظه است غنی‌سازی روی سلول PC3 و نیز رده‌های سلولی کنترل در نهایت منجر به جداسازی ۱۴ نوع توالی پپتیدی شد. پپتید (PC-Pep1) (ALQNSGR) و (WNKYTL PC-Pep2) از بالاترین فراوانی برخوردار بود و ۷ کلون از ۲۱ کلون فاژی تعیین توالی شده این پپتید را نمایش می‌دهد. پپتید (PC-Pep4) (LSNNNLR) و (PC-Pep6) (SPSTHWK) نیز با ۲ بار تکرار، از نظر فراوانی در رتبه‌های بعد قرار داشت. ۱۰ کلون فاژی نیز دارای پپتیدهایی بود که از فراوانی ۱ برخوردار بود و در فرآیند غنی‌سازی تکرار نشده بود. به طور کلی، فراوانی بالاتر یک پپتید نشانگر غنی‌سازی آن در حین انجام فرآیند غنی‌سازی است. این غنی‌سازی احتمالاً می‌تواند بیانگر میل ترکیبی بالا و اختصاصیت پپتید جداسازی در اتصال به ساختار هدف رده‌های سرطانی پروستات باشد. بر این اساس

(۲) که با نتایج تیتراسیون نیز همخوانی داشت. (جدول ۲) بر اساس نتایج به دست آمده ذرات فاژی حاصل از دور چهارم غنی‌سازی روی سلول‌های PC3 به علت داشتن بیشترین شدت جذب برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند.



شکل ۲ بیانگر شدت جذب نوری حاصل از آزمون الایزا انجام شده برای هر کدام از مراحل مختلف غنی‌سازی و نشان دهنده چگونگی روند غنی‌سازی است.

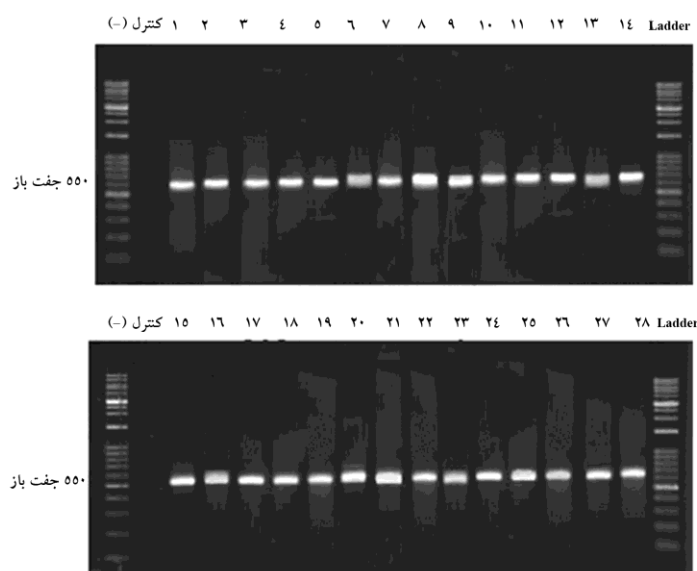
تکثیر DNA فاژی و تعیین توالی نوکلئوتیدی کدکننده پپتیدهای متصل شونده به سلول PC3

کلون‌های فاژی غنی‌سازی شده می‌تواند از طریق تعیین توالی شناسایی شود. به همین منظور سوسپانسیون فاژی به دست آمده از دور چهارم روی سلول PC3 به باکتری ER2738 وارد شد و روی پلیت‌های IPTG/XGAL/Tet کشت داده شد. ۳۰ پلاک آبی رنگ از پلیت‌هایی که کمتر از ۱۸ ساعت در انکوباتور کشت داده شده بود و حداکثر دارای حدود ۱۰۰ پلاک جدا از هم بود و پراکندگی پلاک‌های فاژی در آن‌ها همگن بود انتخاب شد. باید دقت شود که فقط پلاک‌های آبی رنگی که کاملاً مجزا است برداشته شود تا هر پلاک فقط نشان‌دهنده یک مولکول DNA باشد. این امر موجب می‌شود هر پلاکی که انتخاب می‌شود، واجد یک توالی DNA منحصر به فرد باشد. پلیت‌های انتخاب شده نباید بیش از ۱-۳ روز قبل از برداشت پلاک تهیه شده باشد. زمان طولانی موجب کاهش یا از بین رفتن فازها می‌شود.

از پلاک‌های انتخاب شده به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی و برای ذخیره نمودن استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی با آغازگرهای طراحی شده برای ژن PIII

فاژهای بیشتری تعیین توالی شود و در صورت تعداد تکرارهای بیشتر، می توان ادعا نمود که اختصاصیت و میل ترکیبی برای اتصال به سلول های هدف مورد مطالعه را دارد و بنابراین در این تحقیق برای مطالعات تکمیلی استفاده نشد.

می توان گفت پپتیدهای که از فراوانی بالاتری نسبت به سایر پپتیدهای نمایش یافته بر سطح ذرات فاژی، برخوردار بودند ممکن است که پپتیدهای واجد میل ترکیبی و اختصاصیت بالا در اتصال به PC3 باشد. اما در مورد پپتیدهای دیگر تنها زمانی که تعداد



شکل ۳ الکتروفورز بانده ۵۵۰ جفت باز 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 پلاک های فاژی به دست آمده از دور آخر غنی سازی است.

جدول ۳ این جدول توالی پپتیدی و فراوانی فاژهای جداسازی شده طی فرآیند غنی سازی روی سلول PC3 را نشان می دهد. در این جدول اسامی کلون های فاژی، اسامی پپتیدهای نمایش یافته توسط کلون های فاژی مزبور، توالی آمینواسیدی پپتیدهای جدا شده و فراوانی آن ها بیان شده است.

کلون فاژی	نام پپتید	توالی اسید آمینه ای پپتیدها	فراوانی	درصد فراوانی
۱ PC-19, PC-26, PC-7, PC-12	PC-Pep1	ALQNSGR	۴/۲۱	۲۰ درصد
۲ PC-14	PC-Pep2	ALT VSGV	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۳ PC-16, PC-11, PC-2	PC-Pep3	WNAKYTL	۳/۲۱	۱۴ درصد
۴ PC-6, PC-5	PC-Pep4	LSNNNLR	۲/۲۱	۹/۵ درصد
۵ PC-3	PC-Pep5	LPNNNLH	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۶ PC-28, PC-10	PC-Pep6	SPSTHWK	۱/۲۱	۹/۵ درصد
۷ PC-22	PC-Pep7	SLAFWEN	۱/۲۱	۹/۵ درصد
۸ PC-23	PC-Pep8	SLAFWEM	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۹ PC-8	PC-Pep9	ESPSTWR	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۱۰ PC-13	PC-Pep10	PYIRTHS	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۱۱ PC-20	PC-Pep11	SHLYFNK	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۱۲ PC-15	PC-Pep12	NERALTL	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۱۳ PC-21	PC-Pep13	TPSPNVT	۱/۲۱	۴/۷ درصد
۱۴ PC-29	PC-Pep14	LSTHVPR	۱/۲۱	۴/۷ درصد

فراوانی آن در میان مجموع پپتیدهای جد شده در حین فرآیند

توجه به این امر که غنی شدن یک توالی پپتیدی و افزایش

است) بیانگر تعداد بالای آمینواسیدهای آسپارژین، لوسین، سرین، ترئونین، تربیتوفان و آلانین در پپتیدهای جداسازی شده است که می تواند دلیلی بر میل ترکیبی و اختصاصیت آن ها در اتصال به سلول PC3 باشد. جالب این که در بین ۱۵۴ آمینواسید تشکیل دهنده ۲۲ پپتید هفت آمینواسیدی مورد مطالعه اسید آسپارتیک و سیستئین اصلا دیده نشد. متیونین و اسید گلوتامیک و ایزولوسین هم هر کدام تنها یک بار وجود داشت. این تفاوت بین تکرارهای ۲۰ نوع آمینواسید می تواند از طرفی نشان دهنده موفقیت در فرآیند غنی سازی باشد و از طرفی هم مربوط به تکرار غیر تصادفی حین سترز کتابخانه فاژی باشد. از آن جا که شرکت NEB (آمریکا) امکان حضور همه آمینوسیدها را با هم برابر می داند و ادعا می کند که هر کتابخانه از حدود ۲ میلیارد نوع فاژ مستقل تشکیل شده است و در هر موقعیت پپتید کلون شده بدون هیچ گونه برتری هریک از آمینوسیدها به صورت تصادفی می تواند وجود داشته باشد. تنها مورد استثنا حذف پرولین و آمینوسیدهای با بار مثبت از پایانه N پپتید یا پروتئین اتصال به PIII است؛ پس انتظار می رود که عدم برابری و تفاوت بین تکرار آمینوسیدهای مختلف دلیلی بر اختصاصیت اتصال آن ها در اتصال به سلول های مورد مطالعه باشد. وجود دنباله های آمینواسیدی مشترک در کنار تکرار برخی توالی های پپتیدی، بیانگر آنست که فرآیند غنی سازی موجب جداسازی کلون های فاژی و به تبع آن پپتیدهایی شده است که می توان گفت از قابلیت بالقوه بالایی در اتصال به سلول های هدف برخوردار است.

بحث

روش نمایش فاژی (Phage display) ابزار مولکولی بسیار قدرتمندی است که برای شناسایی لیگاندهای اختصاصی استفاده می شود. در تکنولوژی نمایش فاژی پلی پپتیدهای خارجی به صورت ژنتیکی در ژن های کد کننده پروتئین های پوششی فاژ الحاق شده است؛ بنابراین توالی های تصادفی پلی پپتیدها در سطح ویرونی های بالغ نمایش داده می شود. نمایش در سطح فاژ پلی پپتیدها امکان انتخاب بر حسب تمایل (Affinity selection)

غنی سازی یکی از نشانه هایی است که می تواند ما را به اختصاصیت پپتید به دست آمده نسبت به سلول های هدف رهنمون سازد؛ اما بی گمان برای آن که بتوان با اطمینان بیشتری درباره اختصاصیت پپتیدهای جداسازی شده نسبت به سلول هدف بحث کرد، نیاز به انجام مطالعات بیشتری است. این مطالعات می تواند در برگیرنده مجموعه ای از بررسی های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی باشد.

نتیجه بررسی هم ردیفی توالی های پپتیدی حاصل از

تعیین توالی با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی

تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی همگام با روش های آزمایشگاهی در تکنولوژی نمایش فاژی برای شناسایی پپتیدهای اختصاصی به کار می رود. با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی دنباله های مشترک در پپتیدهای جداسازی شده شناسایی می شود. همچنین همولوژی بین پپتیدهای جدا شده با توالی های پروتئینی موجود در پایگاه های اطلاعاتی بررسی می شود که در نهایت می تواند درستی پپتیدهای جدا شده در آزمایشگاه را تأیید نماید. یکی از مهم ترین تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی روی پپتیدهای به دست آمده از غنی سازی شناسایی دنباله های آمینواسیدی مشترک (Consensus amino acid motifs) بین توالی های پپتیدی مزبور است.

به همین منظور از نرم افزار CLUSTAL W برای پیدا کردن دنباله های مشترک بین توالی های پپتیدی حاصل از غنی سازی استفاده شد.

هم ردیفی پپتیدهای حاصل از غنی سازی روی سلول PC3 نیز منجر به شناسایی چند دنباله آمینواسیدی مشترک شد. دنباله های SPST, AL-SG, A-TL, S-T-R, TH, AFW, NW, TV, PSTN, N-K-L و NP از دنباله های تکراری قابل مشاهده است. وجود دنباله های تکراری می تواند دلالت بر غنی شدن آن دنباله در حین فرآیند غنی سازی داشته و می تواند نشان دهنده اختصاصیت دنباله مزبور در اتصال به ساختار هدف باشد. همچنین بررسی درصد و فراوانی هریک از آمینوسیدها (نشان داده نشده

با ظرفیت بالا برای جداسازی کلون‌هایی که به هدف مورد نظر متصل می‌شود را فراهم می‌کند. هدف می‌تواند مولکول‌های غیر پروتئینی یا مولکول‌های پروتئینی، آنزیم، گیرنده سطح سلول، اسید نوکلئیک، کربوهیدرات، سلول، اندام یا تومور و ... باشد [۲۱-۲۵]. ارتباط ژنوتیپ - فنوتیپ در تکنولوژی نمایش فاژی ابزارهای مناسب و ساده‌ای برای جداسازی لیگاندها فراهم می‌کند. این روش این امکان را فراهم می‌آورد که بتوان توالی‌های پپتیدی بسیار متنوعی را در سطح فاژ نمایش داد و بدین ترتیب کتابخانه‌های پپتیدی را ساخت [۲۶]. این گونه از کتابخانه‌های فاژی پپتیدی واجد پپتیدهای بسیار متنوعی است و می‌توان پپتیدهایی را که واجد قابلیت اتصال اختصاصی به یک هدف خاص باشد، از آن‌ها جدا نمود. این هدف می‌تواند پروتئین، آنزیم، سلول، بافت و ... باشد [۲۷]

در سلول‌های سرطانی پروتئین‌های مختلفی وجود دارد که بیان برخی از آن‌ها در حالتی که سلول سرطانی می‌شود، افزایش می‌یابد و از آن‌ها می‌توان به عنوان نشانگرهای سرطان نام برد [۲۸]. نشانگرهای توموری که در سطح سلول‌های سرطانی بیان می‌شود، گزینه‌های بهتر و کارآمدتری برای استفاده به عنوان اهداف غنی‌سازی برای جداسازی پپتیدهای اختصاصی است. پپتیدهایی که به این پروتئین‌های سطحی متصل می‌شود، این قابلیت را دارد که بتوان از آن‌ها برای تشخیص سلول‌های سرطانی و نیز انتقال هدفمند دارو و ژن استفاده نمود. بنابراین شناسایی پپتیدهای اختصاصی متصل شونده به پروتئین‌های سطحی سلول‌های سرطانی افق دید وسیع‌تری را در زمینه درمان هدفمند (Targeted therapy) و ژن درمانی در پیش روی ما می‌گشاید. در سال‌های اخیر، کاربرد کتابخانه‌های نمایش فاژی نقش بسیار مهمی در گسترش کاربرد روش نمایش فاژی داشته است.

تاکنون در مطالعات متعددی از غربالگری کتابخانه‌های نمایش فاژی پپتیدی برای جداسازی و شناسایی پپتیدهای اختصاصی سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان کلون [۲۹] شش [۳۰] گلیوبلاستوما (Glioblastoma) [۳۱] و ...

استفاده شده است.

در مطالعه‌ای لی (Lee) و همکارانش با استفاده از غنی‌سازی کتابخانه نمایش فاژی پپتیدی و جداسازی و بازیابی فاژهای اختصاصی سرطان مثانه از رده‌های سلولی سرطان مثانه و تعیین اختصاصیت اتصال این نانوذرات فاژی به صورت In vivo و In vitro از این نانوذرات هدف‌گیری کننده برای تشخیص سرطان مثانه در نمونه‌های ادراری افراد مبتلا از سالم استفاده نمودند [۳۲]. ژانگ (Zhang) و همکارانش با غربالگری کتابخانه فاژی پپتیدی هفت آمینواسیدی روی سلول‌های سرطانی کولون موفق به شناسایی پپتیدی به نام cp15 شدند که قادر به اتصال اختصاصی به سلول‌های SW480 و HT29 بود [۳۳].

امروزه یکی از مشکلات بسیار مهم درمان سرطان، عدم اختصاصیت روش‌های درمانی موجود است. عدم انتقال هدفمند دارو به سلول‌های سرطانی موجب گریزناپذیر شدن استفاده از دوزهای بالای دارو برای رسیدن به غلظت‌های کارآمد و مؤثر درمانی می‌شود که این امر خود باعث افزایش عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای ضد سرطان می‌شود. بر همین اساس ابداع و طراحی استراتژی‌های کارآمد و مؤثر برای رسانش هدفمند و انتخابی داروها به سلول‌های توموری و در عین حال عدم تأثیر بر سلول‌های طبیعی بدن از اهمیت شایان توجهی در زمینه درمان سرطان برخوردار است. این موارد موجب شده در سال‌های اخیر موضوع درمان هدفمند در حوزه تحقیقات سرطان مورد توجه بسیار قرار گیرد [۳۴].

دستیابی به راه‌های ایمن، ارزان، کارآمد و اختصاصی برای رسانش ژن‌ها و دارو به سلول‌های هدف، افق تازه و جدیدی برای درمان بیماری‌ها است. یکی از جدیدترین رویکردها در این زمینه استفاده از نانوحامل‌های فاژی است که نویدبخش پیدایش نسل جدیدی از ناقل‌های ژنی اختصاصی است. روش نمایش فاژی ابزاری بسیار قدرتمند است که امکان غربالگری با توان بازدهی بالا برای شناسایی و جداسازی لیگاندهای اختصاصی متصل شونده به انواع سلول‌ها و بافت‌ها را فراهم می‌آورد. از

جداسازی پپتیدهای هدفگیری کننده سلول PC3

می توان ادعا نمود که داده های موجود بیانگر اختصاصیت اتصال PC-Pep1 و PC-Pep3 به سلول هدف بوده است. در مجموع نتایج مطالعه حاضر بیانگر آن است که پروتکل غنی سازی مورد استفاده در بررسی حاضر در جداسازی پپتید اختصاصی سلول PC3 موفق بوده است. در بین پپتیدهای به دست آمده، پپتید PC-Pep1 و PC-Pep3 به دلیل فراوانی بالاتر و غنی سازی کارآمدتر در فرآیند غنی سازی می تواند لیگاند اختصاصی مناسبی برای اتصال به سلول های سرطان پروستات باشد. همچنین این پپتیدها با دارا بودن قابلیت اتصال اختصاصی به گیرنده های موجود در سطح سلول هدف می تواند به عنوان ترکیبی بالقوه برای انتقال ژن و دارو مورد استفاده قرار بگیرد. البته این امر نیازمند آن است که اختصاصیت پپتیدهای مزبور نسبت به سلول PC3 با شیوه های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی بیشتری بررسی شود. بدون تردید استفاده از این پپتید برای کاربردهای بالینی نیازمند بررسی های بیشتر به ویژه مطالعات Ex vivo روی نمونه های باقی سرطان پروستات و همچنین بررسی های In vivo در راستای تأیید توانایی آن در اتصال به تومورهای پروستات زئونگرافت (Xenograft) انسانی ایجاد شده در مدل های 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 و گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس اعلام می دارند.

کتابخانه های فاژی پپتیدی که طیف وسیعی از پپتیدهای دارای ویژگی های اتصال منحصربه فرد را نمایش می دهد، می توان برای جداسازی و انتخاب لیگاندهای پپتیدی با اختصاصیت و میل ترکیبی بالا نسبت به انواع سلول های سرطانی استفاده نمود [35]. یکی از مزایای استفاده از کتابخانه های فاژی برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول ها و بافت های مختلف، عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه و پیشین از گیرنده های موجود در سطح سلول های هدف است که مزیت بسیار بزرگی محسوب می شود و موجب تسهیل فرآیند شناسایی لیگاندهای هدفمندکننده می شود.

سرطان پروستات در مردان دومین علت شایع مرگ و میر در اثر سرطان به شمار می رود و از جمله سرطان هایی است که با تغییر روش زندگی شیوع آن رو به افزایش است. متأسفانه روش های رایج امکان پیش بینی و تشخیص به موقع این بیماری را ندارند تاکنون نشانگرهای ایده آلی برای شناسایی سرطان پروستات و همچنین برای رسانش هدفمند داروها شناسایی نشده است. شناسایی نشانگرهای اختصاصی مرتبط با سرطان پروستات می تواند در توسعه روش های تشخیصی و درمانی این بیماری مؤثر باشد. نانو ذرات فاژی پپتیدی که توانایی اتصال اختصاصی به سلول های سرطان پروستات را داشته باشد ممکن است قابلیت استفاده به عنوان نشانگرهای تشخیصی و حتی درمانی را نیز داشته باشد

در این مطالعه از غربالگری کتابخانه پپتیدی Ph.D.TM-7 برای جداسازی لیگاندهای پپتیدی اختصاصی سلول های پروستات استفاده شد. از آنجایی که در بین کلون های حاصل از غنی سازی کتابخانه فاژی روی سلول PC3، کلون های فاژی PC-Pep1 و PC-Pep3 دارای تکرار بیشتری هستند بنابراین

منابع

- [1] Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. Campbell's Urology. 8th ed. Sydney: Elsevier Science Publishers, 2002.
- [2] Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55(1): 10-30.
- [3] Abate-Shen C, Shen MM. Molecular genetics

- of prostate cancer. *Genes Dev* 2000; 14(19): 2410-34.
- [4] Mohagheghi MA, Mosavi-Jarrahi A, Malekzadeh R, Parkin M. Cancer incidence in Tehran metropolis: the first report from the Tehran Population-based Cancer Registry, 1998-2001. *Arch Iran Med* 2009; 12(1): 15-23.
- [5] Frydenberg M, Wijesinha S. Diagnosing prostate cancer - what GPs need to know. *Aust Fam Physician* 2007; 36(5): 345-7.
- [6] Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. *Urology* 1997; 50(2): 239-43.
- [7] Nadler RB, Humphrey PA, Smith DS, Catalona WJ, Ratliff TL. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J Urol* 1995; 154(2 Pt 1): 407-13.
- [8] Carter HB. Assessing risk: does this patient have prostate cancer? *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(8): 506-7.
- [9] Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level $\leq$ 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004; 350(22): 2239-46.
- [10] Tinzi M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004; 46(2): 182-6.
- [11] Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Mâsse B, Piché L, Chypre C. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004; 64(2): 311-5.
- [12] 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.
- [13] Romanov VI, Durand DB, Petrenko VA. Phage display selection of peptides that affect prostate carcinoma cells attachment and invasion. *Prostate* 2001; 47(4): 239-51.
- [14] Petrenko VA, Jayanna PK. Phage protein-targeted cancer nanomedicines. *FEBS Lett* 2014; 588(2): 341-9.
- [15] Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med* 1998; 4(6): 655-7.
- [16] Poul MA, Marks JD. Targeted gene delivery to mammalian cells by filamentous bacteriophage. *J Mol Biol* 1999; 288(2): 203-11.
- [17] Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(16): 6378-82.
- [18] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228(4705): 1315-7.
- [19] Brown KC. Peptidic tumor targeting agents: the road from phage display peptide selections to clinical applications. *Curr Pharm Des* 2010; 16(9): 1040-54.
- [20] Ph.D.TM-7 Phage Display Peptide Library Instruction Manual at www.neb.com/products/e8102-phd-7-phage-display-peptide-library. New England Biolabs.
- [21] Newton JR, Deutscher SL. In vivo bacteriophage

- display for the discovery of novel peptide-based tumor-targeting agents. *Methods Mol Biol* 2009; 504: 275-90.
- [22] Newton JR1, Kelly KA, Mahmood U, Weissleder R, Deutscher SL. In vivo selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice. *Neoplasia* 2006; 8(9): 772-80.
- [23] 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, Troncso 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.
- [24] Agris PF, Marchbank MT, Newman W, Guenther R, Ingram P, Swallow J, Mucha P, Szyk A, Rekowski P, Peletskaya E, Deutscher SL. Experimental models of protein-RNA interaction: isolation and analyses of tRNA(Phe) and U1 snRNA-binding peptides from bacteriophage display libraries. *J Protein Chem* 1999; 18(4): 425-35.
- [25] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996; 380(6572): 364-6.
- [26] Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res* 1991; 51(17): 4716-20.
- [27] Kevin JH, Richard GV, Hardev SP. *Viral Therapy of Cancer*. John Wiley & Sons, Ltd. 2008; p: 114-8.
- [28] Truong LD, Kadmon D, McCune BK, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Association of transforming growth factor-beta with prostate cancer: An immunochemical study. *Hum Pathol* 1993; 24(1): 4-9.
- [29] Kelly KA, Jones DA. Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection. *Neoplasia* 2003; 5(5): 437-44.
- [30] Lee TY, Lin CT, Kuo SY, Chang DK, Wu HC. Peptide-mediated targeting to tumor blood vessels of lung cancer for drug delivery. *Cancer Res* 2007; 67(22): 10958-65.
- [31] Zhang J, Spring H, Schwab M. Neuroblastoma tumor cell-binding peptides identified through random peptide phage display. *Cancer Lett* 2001; 171(2): 153-64.
- [32] Lee SM, Lee EJ, Hong HY, Kwon MK, Kwon TH, Choi JY, Park RW, Kwon TG, Yoo ES, Yoon GS, Kim IS, Ruoslahti E, Lee BH. Targeting bladder tumor cells in vivo and in the urine with a peptide identified by phage display. *Mol Cancer Res* 2007; 5(1): 11-9.
- [33] Zhang Y, Chen J, Zhang Y, Hu Z, Hu D, Pan Y, Ou S, Liu G, Yin X, Zhao J, Ren L, Wang J. Panning and identification of a colon tumor binding peptide from a phage display peptide library. *J Biomol Screen* 2007; 12(3): 429-35.
- [34] Bakhshinejad B1, Karimi M, Sadeghizadeh M. Bacteriophages and medical oncology: targeted gene therapy of cancer. *Med Oncol* 2014; 31(8): 110.
- [35] Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv* 2010; 28(6): 849-58.