

چشم انداز امید بخش درمان سرطان با تکیه بر خواص منحصر به فرد پروتئین آپوپتین در ویروس کم خونی ماکیان

محمد مهدی رنجبر^{1*}، سید داوود موسوی نسب²، نایبعلی احمدی³، غلام بساطی⁴

1) گروه ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

2) گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

3) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

4) گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش:

تاریخ دریافت:

چکیده

سرطان از مهمترین عوامل مرگ انسان به شمار می آید. بسیاری از درمان های شیمیایی و پرتودرمانی فاقد اختصاصیت کافی بر روی سلول های سرطانی بوده و دارای اثرات جانبی بر روی سایر سلولها نیز می باشند. با تکیه بر درک تازه انسان از نحوه پاتوژنز ملکولی سرطان ها می توان دارهای جدید نظیر نانوبادی ها و آنتی بادی های مونوکلونال، مهارگرهای مولکولی کوچک، استراتژی های بر مبنای قطعات کوچک RNA، طراحی پروتئین های مشتق از ویروس ها و باکتری ها با خاصیت کشندگی اختصاصی سلولهای سرطانی و ویروس های مهندسی ژنتیکی شده با خاصیت انکولیتیک، طراحی و تولید کرد. مثال هایی که می توان از پروتئین ضد توموری اختصاصی حاصل از ویروس ها ذکر کرد شامل E4ORF4، Apoptin، E1A، R (Vpr)، Brevinin-2R، پروتئین بزرگ T، TTV، [Chicken anemia virus (CAV)] توسط Yuasa در ژاپن، از گله های تجاری ماکیان جدا شد.

CAV ویروسی مقاوم و منحصر به فرد متعلق جنس *Circoviridae* و خانواده *Gyrovirus* بوده و DNA تک رشته ای حلقوی دارد. عفونت با ویروس باعث بیمار شدن پرنده جوان و تضعیف سیستم ایمنی می شود. سلول های بنیادی خونساز (Hematopoietic stem cells) در مغز استخوان جوجه و پیشسازهای سلول های T در تیموس از هدف های اصلی عفونت با این ویروس می باشند. پروتئین آپوپتین یا VP3 این ویروس پروتئینی کوچک (جرم مولکولی 13/6 kDa) بوده که به وسیله ژن VP3 کد می شود. این پروتئین توجهات و انگیزه های بسیاری را به سبب سمیت بلقوه اختصاصی علیه سلول های سرطانی به خود جلب کرده است. بدین معنی که باعث القای مرگ اختصاصی در سلول های تغییر یافته و سرطانی می شود. آپوپتین موجب میانجی گری آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) شده و مکانیسم این فرایند مستقل از p53 بوده و به واسطه Bcl-2 قابل مسدود شدن نیست. هدف از این مقاله ارائه کاربردها و پیشرفت های نوین در استفاده از پروتئین آپوپتین به عنوان عامل اختصاصی کشنده سلول سرطانی می باشد و بینش عمیقی را نسبت به مکانیسم عملکرد این پروتئین مهیا خواهد کرد. در نهایت هدف ما ارائه مسیر جدیدی جهت درمان سرطان های مختلف با تکیه بر ویروس ها و پروتئین های آنها (ویروس درمانی) می باشد.

واژه های کلیدی: سلول سرطانی، ویروس کم خونی عفونی ماکیان (CAV)، آپوپتین، پروتئین اختصاصی کشنده تومور

*نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

مقدمه

ابن سینا حکیم بزرگ ایرانی، در کتاب مشهور خود با عنوان "قانون در طب" برای نخستین بار راهیافت های جامعی نظیر داروهای ترکیبی و جراحی در اوایل بیماری را با جزئیات بسیار جهت درمان سرطان به صورت مکتوب نگاشته است. از آن زمان تا به امروز دانش بشری همچنان به دنبال ارائه راهکاری کارتر از درمان سرطان می باشد زیرا از مهمترین عوامل مرگ در انسان همچنان همین سرطان می باشد (1).

سرطان یا چنگار به معنی رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیر طبیعی سلول های بدن (متاستاز) است. شروع سرطان با جهش در برخی از ژن های سلول طبیعی همراه است و از این رو سرطان بیماری ژنتیکی می داند. توده سلولی توموری تشکیل شده، ظاهر و عملکرد متفاوت با سلول های طبیعی داشته و می تواند به شکل خوش خیم (رشد آهسته، تصاعدی و عدم تهاجم به بافتهای دیگر) یا بدخیم (رشد سریع، قابلیت متاستاز و در نهایت سبب مرگ بیمار) باشند. عوامل متنوع دخیل در بروز سرطان عبارتند از: الف) عوامل محیطی، نظیر افزایش سن، مواجهه مکرر با آلودگی های محیطی، دخانیات، مواد غذایی، الکل، برخی پرتوها و نیز رشد و تکثیر برخی ویروس ها نظیر هپاتیت، باکتری ها (نظیر هیکوباکتر پیلوری) و سم هایی نظیر آفلاتوکسین،... در ایجاد 75 درصد موارد سرطان نقش دارند. ب) عوامل ژنتیکی از جمله وجود سابقه سرطان بین اعضای نزدیک خانواده، وجود جهش در برخی ژن ها نظیر آنکوژن ها و ژن های سرکوبگر تومور)، عوامل ایمونولوژیک همانند نارسایی مکانیسم محافظت و مراقبت ایمنی طبیعی بدن.

روشهایی رایج درمان سرطان نسبتاً ابتدائی و خام می باشند و عبارتند از: جراحی و برداشت توده سرطانی و به دنبال آن پرتودرمانی و/یا شیمی درمانی که در جهت تخریب باقیمانده سلول های سرطانی استعمال می شوند. در مراحل نهایی یا سرطان های بسیار متاستاتیک با پیش آگهی ضعیف، درمان جراحی صورت نگرفته و تنها اتکا بر استفاده از دوزهای بالای داروهای شیمیایی که فاقد اختصاصیت کافی برای سلول های تغییر یافته (Transformed cells) می باشد.

معضل اصلی این درمان ها اثرات جانبی و همچنین ناکارآمدی آنها در درمان برخی از انواع سرطان ها می باشد زیرا اینها تمام انواع سلول ها در حال تقسیم و عملکرد های آنها را متاثر می کنند. لذا در دوز پائین استفاده می شوند تا اثرات جانبی کمتری بر سلول های غیر سرطانی داشته باشند. امروزه جهت غلبه بر این چالش ها، درمان های نوینی ارائه شده که از آن جمله می توان به ژن درمانی، Anti-angiogenesis (ضد رگ زایی)، Hyperthermia (گرما درمانی یا حرارت درمانی)، درمان بیولوژیکی یا ایمونولوژیک (تحریک و تقویت سیستم ایمنی، تولید آنتی بادی های مونوکلونال و نانوبادی های ضد توموری و اینترفرون گاما)، گیاهان دارویی، لیزر درمانی و یکی از جدیدترین راهکارها؛ ویروس درمانی و به کار گیری پروتئین های مشتق از ویروس و با تأثیر اختصاصی بر سلول های سرطانی می باشد (2). ایران نیز مانند سایر کشورها دارای آمار بالای مرگ و میر به واسطه سرطان ها می باشد، با این تفاوت که جمعیت ایران نسبتاً جوان است و این در برخی موارد موجب شده میانگین سن ابتلا به برخی سرطان ها کاهش چشم گیری یابد که نمود این موضوع در سن ابتلا به سرطان پستان و کولورکتال می توان به وضوح مشاهده کرد که ده سال از میانگین ابتلا در جهان پائین تر است. از سوی دیگر، با توجه به هزینه بالای درمان سرطان و مداوای این بیماران که مکان ها، داروها، ابزارها، تخصص ها و امکانات ویژه ای را طلب می کند، اهمیت پیش گیری و یا تشخیص زود هنگام سرطان های مختلف و توجه به درمان های جدید و موثر امری ضروری به نظر می رسد (3).

استفاده از ویروس ها در تحقیقات سرطان شناسی و درمان نام ویروس تدائی کننده ذهنیت پاتوژن بودن و بیماری زایی است که این تفکر همیشه منطقی به نظر نمی آید. در مطالعات بسیاری از ویروس ها و پروتئین های رمز شونده توسط آنها جهت یافتن راه حلی برای غلبه بر پیچیدگی ها و مشکلات درمان سرطان استفاده شده است. به طور معمول ویروس ها واجد استراتژی های ظریف و متنوعی جهت دستکاری بسیاری از سیستم های سلول میزبان خود هستند تا همانند سازی

ژنوم، بیان پروتئین مخصوص به خودشان، از میان بردن مکانیسم های دفاعی میزبانان و خروجشان از سلول را تسهیل کنند. بسیاری از این استراتژی های ویروسی باعث آشفستگی در سلول میزبان و بیان پروتئین های ویروس می شود که چرخه سلولی، پیام دهی سلولی را متاثر و آپوپتوز را سبب می شود. شاید به همین دلیل بیش از 15 درصد از سرطان های انسانی دارای سبب شناسی مرتبط با عفونت ویروسی هستند (4). از این رو مطالعات بسیاری بر روی مکانیسم این ویروس ها و پروتئین های ویروسی متمرکز شده است و اینکه چطور می توان از این استراتژی های ویروسی در جهت غلبه بر نئوپلازی های مرتبط و غیر مرتبط با ویروس ها استفاده کرد. طبیعت ژنوم ویروس ها بدین صورت است که با تعداد محدود پروتئین تولیدی و با تعداد کم میانکنش های پروتئینی، تاثیر حداکثری را بر روی عملکرد میزبان اعمال کند. لذا قابل درک است که چرا بسیاری از پروتئین های ویروسی در نقاط گره ای (Nodal points) از میانکنش پروتئین های سلول عمل می کنند جایکه یک میانکنش منفرد می تواند تاثیرات پائین دستی وسیعی بر روی عملکرد سلولی داشته باشد. این گرهها در مناطق حیاتی تنظیمی سلول حضور دارند. بسیاری از این نقاط گره ای در کنترل و/یا پیشگیری از بدخیمی های انسانی دست دارند. از این رو مطالعه پروتئین ها تولید شده توسط ویروس ها برای آشکار سازی و تشخیص پروتئین های سرکوبگر تومور مفید است و همچنین از دگر سو بسیاری از تنظیم گره های مشابه، که بر تولیدات ویروس های سرطان زا اثر می گذارند مشخص شده که ارتباط عملکردی با سرطان های انسانی غیر مرتبط با عامل ویروسی دارند. یکی از بزرگترین پیشرفت ها در درک مهارگرهای تومور در سال 1990 بود که مشخص شد که به طور فرضی، بسیاری از DNA ویروس ها، واجد پروتئین هایی هستند که به هر دو مولکول p53 و pBR متصل شده و آنها را مهار می کنند. این کشف جالب باعث روشن شدن نقش این دو مهارگر توموری شد. این دو از مسیر های کلیدی تنظیم کننده رشد در سلول های پستانداران هستند. p53 ژنی سرکوب

کننده تومور است و پروتئینی تولید می کند که در فرایندهای چندگانه مرکزی سلولی شامل رونویسی، ترمیم DNA، ثبات و پایداری ژنوم، کنترل چرخه سلولی، و آپوپتوز دخیل است. p53 در بسیاری از سرطان های انسانی عملکردش مختل و غیرفعال می شود (5، 6). مثال هایی از این پروتئین های ویروسی می توان ذکر کرد همانند Adenovirus E1A و human papilloma virus (HPV) E7 که به pBR متصل شده و میانکنش آن را با E2F مهار می کند. به علاوه پروتئین هایی از ویروس های مشابه، p53 را مورد هدف قرار می دهند نظیر Adenovirus

HPV E6 و E1B55k. پروتئین بزرگ T ویروس SV40 میمون (The Simian Virus 40 (SV40) Large T protein) ناباورانه قادر است به هر دوی تنظیم گره های pBR و p53 متصل و آنها را غیرفعال کند از این رو یک عامل ترانسفورمه بلقوه سلول است (7). از این رو مطالعه میان کنش های ویروس-میزبان در درک گستره وسیعی از فرایندهای سلولی با ارزش است. به عنوان مثال، آپوپتوزی که به واسطه پروتئیت های ویروسی القا می شود مکانیسم رایج تسهیل خروج ویروس و تقویت انتشار ویروس است. بسیاری از ویروس های حیوانی پروتئین هایی را کد می کنند که بلقوه قادرند آپوپتوز را القا کنند و در حالات به خصوصی نیز این فعالیت به طور انتخابی تنها بر سلول های ترانسفورمه عمل می کند.

آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی برای رهایی از سرطانی شدن سلول ها، مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) را به عنوان آخرین راه چاره انتخاب می کنند. در طی آپوپتوز، تخریب غشای هسته و سیتوپلاسم سلول و ارگانل ها منجر به قطعه قطعه شدن سلول می شود که به سرعت به وسیله یاخته های بیگانه خوار (فاگوسیتها) خورده و از محیط ربوده می شوند. در انسان ازدیاد عمل در مرگ برنامه ریزی شده باعث تحلیل بافتها می شود و فقدان عمل موجب تولید سلول های سرطانی می شود. عوامل مهم موثر در آپوپتوز عبارتند از: توکسین ها، هورمون ها، سیتوکین ها، پرتوها، گرما، عفونت ویروسی، کمبود اکسیژن، تغذیه،

از یاد غلظت کلسیم داخل سلول و نیتریک اکسیدها . چندین ژن در تولید مرگ برنامه‌ریزی شده نقش مهمی را ایفاء می کنند از جمله؛ Bcl-2، p53 (که در مورد آن صحبت شد)، Bad، Bim، Bcl-XL و ... را می توان نام برد. پروتئین Bcl-2 سبب رهایی Cytochrome C از میتوکندری‌ها می‌شود که منجر به فعال شدن کاسپاز 9 و سپس کاسپاز 3 می‌شود که سرانجام با خودکشی سلول پایان می‌یابد. پروتئین 2-Bcl می‌تواند هم در بقاء و هم در ممانعت از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش بازی کند (9، 8).

گرایش اختصاصی ویروس‌ها به سلول‌های سرطانی (Viral Oncotropism)

نوآوری در درمان سرطان با تکیه بر مکانیسم‌های عمل جدید که واکنش جانبی با روش‌های درمانی پذیرفته شده نظیر پرتودرمانی، شیمی درمانی و جراحی نداشته باشد به نظر راهکاری مفید می‌آید. تکنولوژی‌های نو بر بسیاری از خواص درمانی ویروس‌ها تکیه و از آنها به عنوان ابزاری در درمان بیماری‌ها بهره می‌برند. در دهه 1920 مشاهده شد که برخی ویروس‌ها ممکن است ظرفیت تکثیر اختصاصی در سلول‌های ترانسفورمه را داشته باشند. متعاقب آن مطالعات دیگر گرایش ویروس‌ها به سلول‌های سرطانی را اثبات و مشخص شد تعداد نسبتاً خیره کننده‌ای از ویروس‌ها واجد قابلیت‌های اختصاصی تمایل به تومور هستند (Ring, 2002, 10). برای مثال می‌توان از vesicular parvoviruses، human reovirus و stomatitis virus (VSV) نام برد. این ویروس‌ها به طور بسیار کارا تری در سلول‌های ترانسفورمه شده تکثیر می‌یابند. البته امروزه دلایل مولکولی و مکانیسم این امر کاملاً مشخص شده است (11، 12، 13). علاوه بر اینکه برخی از ویروس‌ها دارای فعالیت oncotropic و oncolytic هستند، برخی از پروتئین‌های تولیدی ویروس‌ها نیز یافت شده‌اند که جدا از ویروس مولد خود دارای فعالیت اختصاصی و شدیدی نسبت به سلول‌های ترانسفورمه شده هستند. جداسازی مولکولی و بیان جداگانه این پروتئین‌ها اخیراً سبب توجهات زیاد وهیجان‌انگیزی به درک و شناخت فیزیولوژی اختصاصی سلول توموری شده، که با

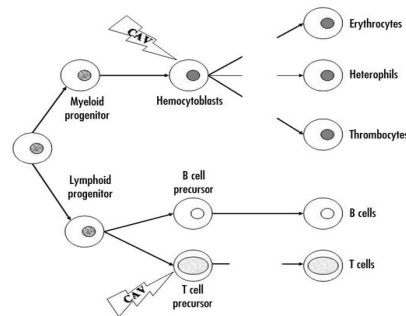
گسترش شناخت این پروتئین‌ها در آینده شاهد داروهای جدیدی برای درمان سرطان خواهیم بود که اهداف متفاوتی را در سلول سرطانی تحت تاثیر قرار می‌دهند. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین آپوئین از ویروس کم خونی عفونی مایکان (CAV) است (14).

ویروس کم خونی مایکان (Chicken anemia virus (CAV) و پروتئین آپوئین

سرکوب ایمنی وضعیت غیر طبیعی سیستم ایمنی است که منجر به کاهش پاسخ ایمنی به آنتی ژن و افزایش حساسیت به بیماری‌ها می‌شود. سرکوب ایمنی گله‌های طیور به گستره‌ای از عوامل عفونی و غیر عفونی منجر می‌شود و باعث خسارات شدیدی به گله‌های طیور می‌شود. در میان آنها ویروس کم خونی مایکان یکی از دلایل مهم این امر به حساب می‌آید (15). ویروس CAV اولین بار در سال 1979 در ژاپن از واکسن‌های آلوده جدا و مشاهده گردید، CAV تلقیح شده به جوجه‌های SPF یک روزه موجب آنمی آپلاستیک می‌شود. خسارات اقتصادی ناشی از CAV شامل افزایش مرگ و میر، رشد کم و نامنظم و هزینه مصرف آنتی بیوتیک است. این ویروس از اکثر کشورها جدا شده و گزارش گردیده است و از طریق مادر به جوجه و نیز با استفاده از واکسن‌های آلوده منتقل می‌شود. در ایران نیز شواهد سرولوژیک آن به اثبات رسیده و به وسیله آزمایش PCR وجود ژنوم آن تأیید شده است (16). این عامل در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی غیر فعال کننده ویروس بسیار مقاوم بوده و حذف ویروس را از محیط مشکل می‌سازد. بیماری ناشی از این ویروس به دو شکل کلینیکی و تحت کلینیکی است و با توجه به ضررهای اقتصادی زیادی که به سبب عفونت در جوجه‌های با سن 2-4 هفته ایجاد می‌کند نمی‌توان از آن چشم‌پوشی کرد. علائم بیماری شامل کم خونی آپلاستیک و آتروفی بافت‌های لنفوئیدی (به ویژه تیموس) توام با سرکوب ایمنی (به سبب کاهش لنفوسیت T)، آتروفی مغزاستخوان (به ویژه ران) و خونریزی قابل مشاهده در مخاط و زیر مخاط معده و خونریزی ماهیچه‌ای که گاهی با کم خونی شدید همراه می‌شود که با دخالت سایر

عفونتهای ویروسی، باکتریال، یا قارچی به وخامت می

گراید (شکل 1). (15).

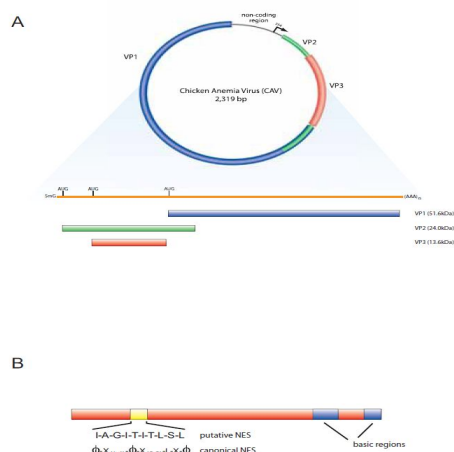


شکل 1. اثرات CAV بر روی سلول های لنفوئیدی و هموسایتوبلاست. CAV هموسایتوبلاست ها و پیش سازهای سلول T را در مغز استخوان آلوده می کند. عفونت این سلول ها منجر به مرگشان می شود و بنابراین منجر به کاهش گلبول های قرمز، هتروفیلها، ترمبوسیت ها و سلولهای T می شود (Adair, 2000).

رونویسی، ترجمه می شوند. پروتئین های ویروسی؛ شامل VP1 (51 kDa) پروتئین کپسید، VP2 (kDa) 24 فسفاتاز، سومین VP3 به وزن 13,6 کیلو دالتون همراه با هسته سلولهای عفونی است ولی در اجرام ویروسی تخلیص شده وجود ندارد و پروتئینی غیر ساختمانی است. وجود کامل و بی نقص هر سه این پروتئین ها برای چرخه زندگی عفونی ویروس لازم است (شکل 2) (17, 15).

مرفولوژی ویروس CAV

CAV، 20، وجهی با متوسط قطر 25-26/5 نانومتر و واجد DNA تک رشته ای، حلقوی و سنس منفی است. ژنوم CAV حاوی سه قالب خوانش باز عملکردی (functional open reading frames) می باشد (شکل 2) که همه اینها از یک رونوشت (polycistronic and polyadenylated) بوسیله عناصر پرئوموتر و افزاینده در بالادست ناحیه شروع



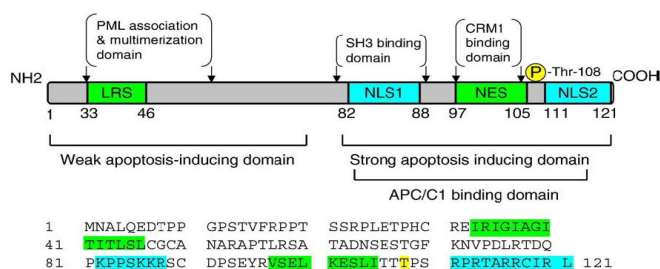
شکل 2. ویروس کم خونی عفونی ماکیان (Chicken Anemia Virus (CAV)). (A) این دیاگرام ژنوم DNA تک رشته ای حلقوی CAV را نشان می دهد. رونویسی از ناحیه ای مجزایی (354bp) در پائین دست noncoding Region شروع می شود و تولید mRNA، polycystronic، polyadenylated، می کند. ترجمه از کدون های شروع جایگزین رخ می دهد تا سه پروتئین CAV، VP1، VP2، و VP3 تولید شوند. منطقه رمز کننده VP3 درون VP2 قرار دارد و از یک قالب خوانش جایگزین ترجمه شده است. (B) تصویر شماتیک دومین های پروتئین VP3. تحلیل توالی یک سیگنال خروج از هسته (nuclear export signal (NES)) مفروض را در سمت انتهای N آشکار می کند. توالی استاندارد مورد توافق همگانی NES نشان داده شده است. تکه های ابتدایی در انتهای C احتمالاً عملکردشان تسهیل ورود به هسته می باشد.

نیاز است شکل 3 (18). در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بافت های آلوده مشاهده شد که پروتئین VP3 در هسته بوده و با گذر زمان این پروتئین به صورت خوشه های بزرگ متقارن مجتمع شده (به صورت مولتیمر کروی با پیوند غیرکووالان) و سبب رخداد آپتوز می شود (19، 17). پروتئین آپوتین به طور اختصاصی باعث آپتوز در سلول های تغییر یافته (ترانسفورمه شده) می شود در حالی که بر سلول های طبیعی بی تاثیر است. این اختصاصیت تا اندازه بسیار، به سبب محل حضورش در سلول است؛ در سلولهای طبیعی آپوتین سیتوپلاسمی است اما در سلول های ترانسفورمه شده این پروتئین در هسته لوکالیزه می شود. لوکالیزه شدن آپوتین در هسته به طور گسترده ای توسط فسفریله شدن آن تنظیم می شود. البته انتقال هدف دار آپوتین به درون هسته جهت القای آپتوز کافی به نظر نمی رسد. آپوتین برای ایجاد سمیت اختصاصی روی تومور، نیاز به شرکای میانکنش دهنده دیگری نیز دارد تا مسیر های پیام دهی بخصوصی را در سلول های سرطانی فعال کنند. تعدادی از مولکول ها نیز برای این امر پیشنهاد

پروتئین آپوتین به وسیله ژن VP3 ویروس کد می شود و یک محرک قوی برای مرگ سلولها ی تیموس و رده های سلولی لمفوبلاستوئید جوجه است. آپوتین از 121 اسید آمینه تشکیل شده و توالی سکانس آن همولوژی قابل ملاحظه ای با پروتئین های شناخته شده سلولی ندارد. قسمت انتهای C آپوتین شامل یک سکانس (توالی) لوکالیزاسیون دو قسمتی هسته ای (bipartite sequence (NLS)) می باشد. محدوده NLS1 از اسید آمینه 82-88 و محدوده NLS2 از اسید آمینه های باقیمانده 111-121 است (Danen-Van Oorschot, 2003). مضافاً، آپوتین واجد یک سکانس خروج از هسته فرضی export sequence (NES) putative nuclear در باقیمانده اسید آمینه 75-105 می باشد. این سکانس شناسایی سبب حرکت رفت و آمدی آپوتین به درون و بیرون از هسته می شود (شکل 3). همچنین آپوتین یک قطعه لنگرگاه کوچک غنی از لوسین هیدروفوبیک دارد (از اسید آمینه 33-46) که برای ارتباط خود پروتئین و نیز اتصال به پروتئین پرومیلوسیتیک لوسمی و شرکای واکنشی اش

شده اند و به نظر می رسد برای لوکالیزاسیون هسته ای یا سایتوتوکسیسیته اختصاصی توموری آن ضروری

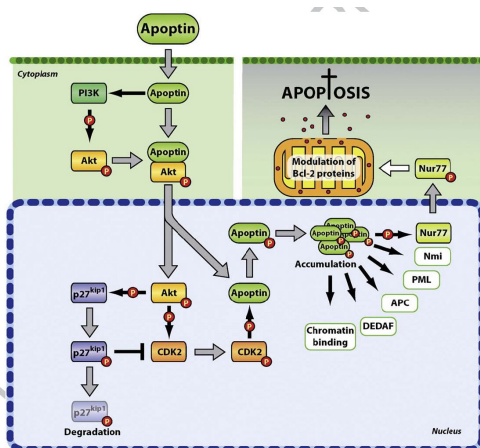
هستند (20).



شکل 3. ساختار اولیه آپوپتین. دومین های کلیدی و سکانس های مهم نشان داده شده اند. در پایین شکل سکانس آپوپتین را می بینید. (UniProtKB/Swiss-Prot entry P54094). آمینو اسیدهایی که با رنگ های سبز و آبی هستند نشان دهنده دومین در بالای شکل می باشند. برای فهم جزئیات می توانید به متن مراجعه کنید.

های مسیر میتوکندریایی (نظیر Apaf-1) است. علاوه بر این، آپوپتین ترشح سیتوکروم C را تحریک می کند و باعث فعال شدن کاسپاز 9 می شود. در مورد نقش ضد آپوپتوزی Bcl-2 در مرگ سلولی با میانجی گری آپوپتین اختلاف نظر وجود دارد، بعضی محققین مرگ سلولی با میانجیگری آپوپتین را مستقل از آن دانسته و بعضی آن را موثر می دانند شکل 4 (20). تحقیقات نشان داده مرگ در سلول های توموری (رده های سلول لنفوبلاستوئید انسانی و سلول استئوسارکوما انسان) از P53 مستقل و بوسیله بلوک Bcl-2 نیز نمی تواند رخ دهد ولی با Bcl39 تسریع می شود. همچنین فعالیت کاسپاز 3 سلولی و یکی از کاسپاز های پائین دستی برای انجام مرگ سلولی برنامه ریزی شده با آپوپتین ضروری است (20). جالب است در طیوری که حامل تومور القا شده توسط ویروس Rous sarcoma می باشند بیان داخل توموری آپوپتین موجب رگرسیون تومور می شود (21).

مکانیسم میانجی گری مرگ سلولی آپوپتین آپوپتین تنها از یک مسیر خاص توانایش در آپوپتوز را اعمال نمی کند؛ اما مورد کلیدی توانایی آپوپتین در القای اختصاصی سلول های توموری از مسیری مستقل از p53 است. از این رو آپوپتین بر روی سلول های که فاقد p53 هستند یا شکل وحشی یا جهش یافته آن را بیان می کنند نیز موثر است (16). آپوپتوز، عموماً به وسیله سیستمین پروتازهای درون سلولی (کاسپازها) میانجیگری می شود، این عملکرد بخش آغازگر و اجرائی فرایند آپوپتوز است. فعال سازی کاسپاز ها، با دو مسیر اصلی پیام رسانی؛ پذیرنده پیام رسان مرگ خارجی و مسیر میتوکندریایی داخلی (20) صورت می گیرد. بیان آپوپتین منجر به فعال سازی کاسپاز ها می شود. مرگ سلولی با میانجیگری آپوپتین به هر حال مستقل از پذیرنده های مرگ نظیر CD95 و کاسپازها (کاسپاز 8) و FADD است، در مقابل آپاپتوز با واسطه آپوپتین به شدت متاثر از تنظیم کننده



شکل 4. مکانیسم پیشنهاد شده برای نحوه عملکرد آپوپتین در سلول های سرطانی. تحریکات آپوپتین منجر به فسفریلاسیون Nur77 و خروج آن از هسته می شود. در سیتوپلاسم Nur77 باعث تنظیم کردن پروتئین Bcl-2 با تغییر آن از مولکول ضد آپوپتوتیک به مولکول پیش آپوپتوزی می شود.

است که مجاور NES است. به نظر می رسد که فسفریلاسیون در Thr-108 تجمع اختصاصی هسته ای آپوپتین را در سلول های توموری از طریق غیر فعال سازی NES هدایت می کند (20).

روش کار: (به طور خلاصه)

1. جداسازی و شناسایی ویروس CAV (یا تهیه به صورت آماده)

2. استخراج محتوای ژنوم ویروس و طراحی پرایمر مناسب برای قطعه موردنظر

3. تقویت و تزاید ژن آپوپتین با روش PCR

4. الکتروفورز روی ژل و تخلص محصول PCR

5. قرار دادن قطعه مورد نظر بر روی وکتور (Ligation)

6. انتقال وکتور به باکتری E.coli (Transformation)

یا سایر سیستم ها

7. رشد و تقویت سلولهای مستعد واجد پلازمید نو ترکیب

8. تخلص پروتئین نو ترکیب تولید شده

9. بررسی پتانسیل سایتوتوکسیسیته پروتئین بر روی

سلول های لاین سرطانی استاندارد با روش هایی نظیر

ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ ایمونوفلورسانس و ...

بحث و نتیجه گیری

اگرچه پیشرفت های شگرفی در دهه های گذشته

در درمان سرطان صورت گرفت است. اما هنوز

مشکلات اساسی باعث محدود شدن برخی از این

انتقال هسته ای آپوپتین - ضروری برای فعالیت

آپوپتوزی آپوپتین

داده های تجربی نشان می دهد که رفت و آمد

هسته ای - سیتوپلاسمی آپوپتین بوسیله هر دو قسمت

NLS و انتهای NES انجام می شود، بدین صورت

که NLS در هر دو نوع سلول فعال است اما فعالیتش

در سلول طبیعی بسیار کمتر بوده لذا مقدار بسیار جزئی

از آپوپتین وارد هسته می شود (شکل 3). از سوی دیگر

مشخص شده که CRM1-regulated NES تنها در

سلول های سالم فعال است لذا در آنها آپوپتین در

سیتوپلاسم باقی می ماند. آپوپتین همچنین واجد توالی

غنی از لوسین است که برای واکنش با پروتئین PML

و پروتئین های دیگر ضروری است. جهش هایی که

این توالی را غیر فعال می کند نه تنها باعث می شوند

که فعالیت آپوپتین مرتبط با اجسام PML، بلکه

همچنین تجمع هسته ای آپوپتین در سلول های

توموری مهار شود (20).

فسفریلاسیون آپوپتین و نقش آن در القای آپوپتوز

جهت پیام های که هسته را هدف قرار می دهند،

فسفریلاسیون آپوپتین در القای سیگنال های مرگ در

سلول های سرطانی ضروری است. با نگاهی به نقشه

پروتئین آپوپتین مشخص شده که آپوپتین داری محل

فسفریلاسیون در جایگاه ترئونین 108 (Thr-108)

نوآوری های درمانی شده است. از این موانع می توان

- (1) اثرات جانبی شدید بواسطه سایتوتوکسیسیته غیر اختصاصی این درمانها (2) توسعه مقاومت های دارویی
- (3) افزایش مقاومت تومورها به آپوپتوزیس (4) با اینکه داروهای سایتوتوکسیک موجب حفظ زندگی بیماران سرطانی می شوند، اما می تواند برای کسانی که آنها را تجویز یا حمل و نقل می کنند بسیار خطرناک باشند. عوامل آلکیله کننده، آنتی متابولیت ها و آنتی بیوتیک ها نظیر Adriamycin داروهای بسیار معمولی هستند که بر پایه عملکرد p53 در جهت بسیج سلول ها به آپوپتوز، عمل می کنند. به همین سبب در بسیاری از سرطان های انسانی، عملکرد p53 از دست می رود لذا آنها به درمان با هر کدام از این عوامل مقاوم شده اند. واضح است که در این شرایط نیاز به درمان های اختصاصی بیشتری برای سلول های ترانسفورمه شده می باشد که متکی بر عملکرد p53 جهت القای مرگ برنامه ریزی شده سلول نباشند (22). به طور ایده آل، یک عامل ضد سرطان می بایست واجد شرایطی باشد و باید قادر باشد که (1) تنها تکثیر سلول های غیر طبیعی را که از فقدان تنظیم طبیعی چرخه سلول حاصل شده اند را مسدود کند نظیر جهش های در نقاط ایست بازرسی سلول (checkpoint mutations; 2) طوری چرخه سلول را مسدود کند تا منجر به مرگ سلول یا آپوپتوز شود؛ (3) منحصرأ باعث مرگ سلول های سرطانی شود و فاقد تاثیر یا بسیار تاثیر اندک بر روی سلول های طبیعی باشد؛ (4) قادر به غلبه بر سرطان های مقاوم به آپوپتوز باشد، یکی از معضلاتی که در بسیاری از سرطان ها دیده می شود؛ (5) فرایند اثر آن در کشتن سلول مستقل از جهش های سرطانی معمول نظیر p53 باشد؛ (6) وقتی که سایر درمان های شیمیایی شکست می خورند بتواند به عنوان راه چاره جهت درمان سلول های مقاوم به سرطان مطرح شوند و (7) به راحتی جذب شوند یا بوسیله سلول ها به شکل فعال اولیه شان ترشح شوند. آپوپتین واجد بسیاری از این محاسن می باشد (23).

چشم انداز استفاده بالینی آپوپتین و آپوپتین به عنوان راه چاره، القای آپوپتوز در سلول های تومور

گزارشات نشان داده است که آپوپتین سبب القای مرگ انتخابی در رده های سلولی مشتق از سرطان های انسانی نظیر ملانوما، هپاتوما، cholangiocarcinoma، کارسینوم کولون، سرطان سینه و ریه و سایر سرطان ها شده است. در واقع تا به امروز 70 رده سلولی در انسان نشان داده شده که به آپوپتین حساس می باشند. نکته جالب اینکه آپوپتین سبب القای آپوپتوز در سلول های سالم با قابلیت تکثیر نظیر سلول های اندوتلیال، هپاتوسیت ها و سلول های بنیادی خون ساز نمی شود. بنابراین حساسیت به آپوپتین وابسته به تغییرات مرتبط با حالت ترانسفورمه شدن سلول است (18). توانایی آپوپتین جهت القای آپوپتوز مستقل از p53 و تغییر جهت مسیرهای زنده مانی با پیام پیش آپوپتوزی، باعث اهمیت دوچندان فارماکولوژیک آن می شود. این خصوصیات برجسته را می توان برای درمان سرطان به کار برد. مطالعات اخیر نشان داده است که تنظیم پائین Survivin همگام با بیان آپوپتین به طور معناداری میزان سلول های آپوپتوتیک را در مقایسه با تاثیر هر کدام از آنها به تنهایی افزایش داده است (24، 25). این یافته ها نشان می دهد که استراتژی ترکیبی استفاده از آپوپتین و یک تنظیم گر پائین دست نظیر Survivin می تواند در کنترل رشد تومورهای مقاوم به شیمی درمانی مفید باشد. مطالعه دیگر پیشنهاد کرد که درمان ترکیبی با آپوپتین و اینترلوکین 18 باعث پاسخ شدید Th1 در مقابل سرطان Lewis lung carcinomas می شود و این امر منجر به مهار معنی دار رشد سلول های این تومور شده است (26). به همین نحو، رهیافت درمان ترکیبی با آدنو ویروس نوترکیب که آپوپتین را بیان می کرد با Ectoposide (نوعی داروی ضد سرطان) اثر سمیت مضاعف را بر روی رده سلول های سرطان osteosarcoma U2OS نشان داد و به طور کلی به کار گیری آپوپتین با سایر درمان های رایج به صورت ترکیبی اثرات سودمندی به دنبال دارد (27). مهمترین چالش تحقیقات بر روی آپوپتین توسعه روشی جهت تحویل کارآمد آپوپتین در ناحیه آسیب توموری است. Noteborn و همکارانش استراتژی را پیش گرفتند که در آن از وکتورهای آدنوویروسی استفاده کردند. یک

داشت. فرایند مولکولی نحوه اعمال اثر انتخابی این پروتئین ها بر روی سلول های سرطانی نیز به طور گسترده ای شناسایی شده است. از این پروتئین ها می توان به سایتوکاین TRAIL، پروتئین ویروسی E4orf4 (adenovirus open reading frame 4) با مکانیسم نسبتا مشابه با آپوتین، پروتئین TTV (apoptosis-inducing protein (TAIP) Torque teno virus (TTV)، پروتئین HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells) که تا اندازه ای عملکردی شبیه آپوتین داشته و از شیر انسان جدا شده است، اشاره کرد (20).

آپوتین و سایر پروتئین های نو ترکیب اختصاصی ضد توموری و ویروس هایی که به صورت ژنتیکی مهندسی شده اند روز به روز در درمان سرطان بیشتر مطرح می شوند، اینها نه تنها برای فهم و درک فرایند بیولوژیک سرطان زایی و رفتار آن بسیار مهم می باشند بلکه در آینده نزدیک نهایتا منجر به انتخاب های جدید درمانی برای سرطان های مقاوم و بدخیم خواهند بود و بدین صورت آلام وسختی های ناشی از درمان را در بیماران خواهند کاست.

References

- 1-The Canon of Medicine" (work by Avicenna)". Encyclopædia Britannica. 2008. Retrieved 2008-06-11.
- 2-Kinzler KW, Vogelstein B, editors. Genetic Basis of Human Cancer. 2nd edition. McGraw-Hill; 2002. pp. 1-20.
- 3-Smith RA, Brooks D, Cokkinides V, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2013: A review of current american cancer society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. CA Cancer J Clin. 2013; 63(2):87-105.
- 4-Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. Carcinogenesis 2000; 21: 405-26.
- 5-Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. J Natl Cancer Inst 1996; 88:1442-55.

تزریق جداگانه آدنوویروسی که پروتئین آپوتین را بیان می کرد منجر به تاخیر چشمگیری در رشد تومور شد. مضافا، جهت افزایش القای اثربخشی هدایت پروتئین، برخی از مطالعات ویروس های دیگری را نیز مورد بررسی قرار داده اند. برای مثال، اخیرا مطالعه ای نشان داده عفونت با ویروس آبله طیور که فاقد توان تکثیر و حامل ژن آپوتین بوده منجر به القای معنی دار آپوتوز در سلول های هپاتوما و همچنین به شکل کارآمدی منجر به جلوگیری از رشد توموری زیرجلدی در موش شده است. از رهیافت های دیگر به کار رفته می توان از کنجوگه های لیگاندی پذیرنده سیالوگلیکوپروتئین (ligand conjugates of the asialoglycoprotein receptor) و مشتقات آپوتین که با دومن های ترانسداکشن جفت شده اند نظیر HIV-Tat نام برد که نتایج نسبتا رضایت بخشی به دنبال داشته اند (20).

سایر پروتئین های کشنده اختصاصی سلول های توموری

در کنار آپوتین پروتئین های اختصاصی ضد تومور دیگری نیز شناسایی شده اند که تاثیرات شگرفی در طراحی نسل آینده داروهای ضد سرطان خواهند

- 6-Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. Nat Med 2004; 10:789-99.
- 7-Gatza ML, Chandhasin C, Ducu RI, Marriott SJ. Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. Environ Mol Mutagen 2005; 5: 304-25.
- 8-Zhou GP, Doctor K. Subcellular location prediction of apoptosis proteins. Protein Struc Func Gen 2003; 50: 44-48.
- 9-Fesik SW, Shi Y. Controlling the Caspases. Science 2001; 294: 1477-8.
- 10-Ring CJ. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. J General Virol 2002; 83:491-502.
- 11-BarberGN. VSV-tumor selective replication and protein translation. Oncogene 2005; 24:7710-9.
- 12-Geletneky K., Herrero YCM, Rommelaere J, Schlehofer JR. Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: a brief review. J Veterin

- Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52: 327-30.
- 13-Wollmann G, Tattersall P, van den Pol AN. Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol* 2005; 79: 6005-22.
- 14-Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF. Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosine protein phosphatase activities. *J General Virol* 2005; 86: 623-30.
- 15-Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Disease of poultry. In: *Chicken Infectious anemia and other Cirovirus infections*. 12th ed. Blackwell; 2008.
- 16-Zhuang SM, Shvarts A, van Ormondt H, Jochemsen AG, van der Eb AJ, Noteborn MH. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 486-9.
- 17-Noteborn HM, van Oorschot D, van der Eb AJ. Chicken anemia virus: induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. *Semin Virol* 1998; 8: 497-504.
- 18-Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, Zimmerman R, Visser M, Voskamp P, et al. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation. *Ann Rev Pharm Toxicol* 2008;48: 143-169.
- 19-Leliveld SR, Zhang YH, Rohn JL, Noteborn MH, Abrahams JP. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. *J Biol Chem* 2003;278: 9042-51.
- 20-Los M. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009. doi:10.1016/j.bbamcr.04.002.
- 21-Natesan S, Kataria JM, Dhama K, Bhardwaj N, Sylvester A. Anti-neoplastic effect of chicken anemia virus VP3 protein (apoptin) in Rous sarcoma virus-induced tumours in chicken. *J General Virol* 2006; 87: 2933-40.
- 22-Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta Res Commun* 2005; 331: 834-42.
- 23-Zhao RY, Liang D, Li G, Larrimore CW, Mirkin BL. Anti-cancer effect of HIV-1 viral protein R on doxorubicin resistant neuroblastoma. *PLoS ONE* 2010;5: e11466.
- 24-Liu Q, Fu H, Xing R, Tie Y, Zhu J, Sun Z, et al. Survivin knockdown combined with apoptin overexpression inhibits cell growth significantly. *Cancer Biol Therapy* 2008;7: 1053-60.
- 25-Panigrahi S, Klonisch T, Los M. The art of killing: double stroke with apoptin and survivin: a novel approach in cancer therapy. *Cancer Biol Therapy* 2008; 743:71061-2.
- 26-Lian H, Jin N, Li X, Mi Z, Zhang J, Sun L, et al. Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin. *Cancer Immunol* 2007;56: 181-92.
- 27-Olijslagers SJ, Zhang YH, Backendorf C, Noteborn MH. Additive cytotoxic effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100: 127-31.

Promising therapeutic approaches for cancer based on unique features of Apoptin protein from chicken anemia virus

Ranjbar M.M^{1*}, Mousavi Nasab S.D², Ahmadi N³, Basati Gh⁴

(Received:

Accepted:)

Abstract

Cancer considered as the leading causes of the humans death. The most of chemo- and radiotherapies have no adequate specificity on cancerous cells and in addition they have adverse effects on normal cells. According to the new knowledge on the molecular pathogenesis of cancer, other therapeutic strategies such as nanobodies, monoclonal antibodies, small molecule inhibitors, mimetic-, antisense-, and small interference RNA-based molecules could be designed. Many tumor-specific killer proteins could be derived from both human and animal viruses such as E4ORF4 and VP3 (apoptin), E1A, viral protein R (VpR), Brevinin-2R, Large T protein, TTV apoptosis-inducing protein (TAIP). Chicken anemia virus (CAV) was isolated in 1979 by Yuasa (Japan), in commercial poultry.

CAV is a resistant and ubiquitous virus belongs to the Gyrovirus genus, Circoviridae family, and has a circular single strand DNA. It leads to disease and immunosuppression in the young chickens of all birds. Hematopoietic stem cells in the bone marrow and T-cell precursors in the

thymus are the major targets for the virus infection. Apoptin (or VP3) is a small protein (Mw, 14 kDa) encoded by the VP3 gene of CAV. It has attracted great attention because of its tumor-selective toxicity potency. The virus induces cell death specifically in the human transformed or tumor cells. In normal cells, Apoptin remains in the cytoplasm; whereas in cancerous cells, it translocates into the nucleus and kills the cell. By nuclear localization of Apoptin, it mediate apoptosis and this mechanism is p53-independent and cannot be blocked by Bcl-2. This article aims to present a current applications and novel progresses of using apoptin as tumor-specific killer agent and will provide an insight into the possible mechanism of action. Finally we will discuss a new direction for the therapeutic uses of viruses and viral proteins for the treatment of different kinds of cancers.

Key word: Cancer cell, chicken anemia virus (CAV), Apoptin, tumor-specific killer protein

1. Dept of Pathobiology, Faculty of Veterinary Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Dept of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Proteomics Research Center, School of Paramedicine, Shahid Behshiti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Dept of Clinical Biochemistry, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

*(corresponding author)