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 نسب[2]، نایبعلی احمدی [3]، غلام بساطی[4]

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 برروی 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 apoptosis-inducing protein (TAIP) است. ویروس کم خونی عفونی ماکیان [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 اختصاصیش 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 ار پروئین آپوپتیتن 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

Email: MM.Ranjbar.phd@gmail.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

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 کاراتر از درمان سرطان می باشد زیرا از مهمترین عوامل مرگ در انسان همچنان همین سرطان می باشد (1).

سَرَطان یا چَنگار به معنی رشد، تکثیر و گاهی انتشار غیر طبیعی سلول‌های بدن(متاستاز) است. شروع سرطان با جهش در برخی از ژن‌های سلول طبیعی همراه است و از این رو سرطان بیماری ژنتیکی می دانند. توده سلولی توموری تشکیل شده، ظاهر و عملکرد متفاوت با سلول های طبیعی داشته و می توانند 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 ویروس‌ها 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 ژن‌ها نظیر آنکوژن ها و ژن‌های سرکوبگر تومور)، عوامل ایمنولوژیک همانند نارسایی مکانیسم محافظت و مراقبت ایمنی طبیعی بدن.

روشهایی رایج درمان سرطان نسبتا 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 اگهی ضعیف، درمان جراحی صورت نگرفته و تنها اتکا بر استفاده از دوزهای بالای داروهای شیمیایی که فاقد اختصاصیت کافی برای سلول های تغییر یافته (Transformated cells) می باشد. معضل اصلی این درمان ها اثرات جانبی و همچنین ناکارامدی 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 نسبتا 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

ژنوم، بیان پروتئین مخصوص به خودشان، از میان بردن مکانیسم های دفاعی میزبانشان و خروجشان از سلول را تسهیل کنند. بسیاری از این استراتژی های ویروسی باعث آشفتگی 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 تعد اد 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 جائیکه 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 گرهای گره ای 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 سال1990 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 هستند1. 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 (6، 5). مثال هایی از این پروتئین های ویروسی می توان ذکر کردهمانند 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 E1B55k و HPV E6 . پروتئین بزرگ T ویروس SV40 میمون (The Simian Virus 40 (SV40) Large T protein) ناباورانه قادر است به هر دوی تنظیم گرهای 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 فرایند های 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 برنامه‌ریزی شده سلولی

برای رهایی از سرطانی شدن سلول‌ها، مرگ برنامه‌ریزی شده(آپوپتوز) را به عنوان آخرین راه چاره انتخاب می کنند .در طی آپوپتوز، تخریب غشای هسته و سیتوپلاسم سلول و ارگانل‌ها منجر به قطعه قطعه شدن سلول می‌شود که به سرعت به‌وسیله یاخته‌های بیگانه‌خوار (فاگوسیتها) خورده و از محیط ربوده می‌شوند. در انسان ازدیاد عمل در مرگ برنامه‌ریزی شده باعث تحلیل بافت‌ها می‌شود و فقدان عمل موجب تولید سلول‌های سرطانی می‌شود. عوامل مهم موثر در آپوپتوز عبارتند از: توکسین‌ها، هورمون‌ها، سیتوکین‌ها، پرتوها، گرما،عفونت ویروسی،کمبود اکسیژن، تغذیه،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

ازدیاد 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)، Bcl-XL، Bim، Bad 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 Bcl-2 می‌تواند هم در بقاء و هم در ممانعت از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول نقش بازی کند (9، 8).

گرایش اختصاصی ویروس ها به سلول های سرطانی (Viral Oncotropism)

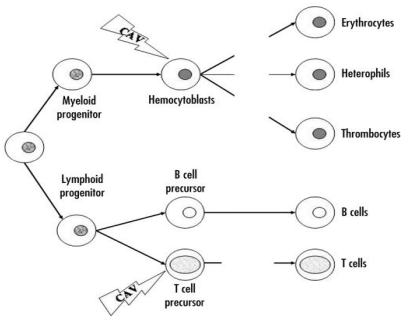
نوآوری در درمان سرطان با تکیه بر مکانیسم های عمل جدید که واکنش جانبی با روش های درمانی پذیرفته شده نظیر پرتودرمانی، شیمی درمانی و جراحی نداشته باشد به نظر راهکاری مفید می آید. تکنولوژی های نو بر بسیاری از خواص درمانی ویروس ها تکیه و از آنها به عنوان ابزاری در درمان بیماری ها بهره می برند. در دهه 1920 مشاهده شد که برخی ویروس ها ممکن است ظرفیت تکثیر اختصاصی در سلول های ترانسفورمه را داشته باشند. متعاقب آن مطالعات دیگر گرایش ویروس ها به سلول های سرطانی را اثبات و مشخص شد تعداد نسبتا خیره کننده ای از ویروس ها واجد قابلیت های اختصاصی تمایل به تومور هستند (Ring, 2002، 10). برای مثال می توان از parvoviruses، human reovirus و vesicular stomatitis virus (VSV) نام برد. این ویروس ها به طور بسیار کارا تری در سلول های ترانسفورمه شده تکثیر می یابند. البته امروزه دلایل مولکولی و مکانیسم این امر کاملا مشخص شده است (13، 12، 11). علاوه بر اینکه برخی از ویروس ها دارای فعالیت oncotropic و oncolytic هستند، برخی از پروتئین های تولیدی ویروس ها نیز یافت شده اند که جدا از ویروس مولد خود دارای فعالیت اختصاصی و شدیدی نسبت به سلول های ترانسفورمه شده هستند. جداسازی مولکولی و بیان جداگانه این پروتئین ها اخیرا سبب توجهات زیاد وهیجان انگیزی به درک و شناخت فیزیولوژی اختصاصی سلول توموری شده، که با گسترش شناخت این پروتئین ها در آینده شاهد داروهای جدیدی برای درمان سرطان خواهیم بود که اهداف متفاوتی را در سلول سرطانی تحت تاثیر قرار می دهند. یکی از این پروتئین ها، پروتئین آپوپتین از ویروس کم خونی عفونی ماکیان (CAV) است (14).

ویروس کم خونی ماکیان(Chicken anemia virus (CAV)) و پروتئین آپوپتین

سرکوب ایمنی وضعیت غیر طبیعی سیستم ایمنی است که منجر به کاهش پاسخ ایمنی به آنتی ژن و افزایش حساسیت به بیماری ها می شود. سرکوب ایمنی گله های طیور به گستره ای از عوامل عفونی و غیر عفونی منجر می شود و باعث خسارات شدیدی به گله های طیور می شود. در میان آنها ویروس کم خونی ماکیان یکی از دلایل مهم این امر به حساب می آید(15). ویروس CAV اولین بار در سال 1979 در ژاپن از واکسن های آلوده جدا و مشاهده گردید، CAV تلقیح شده به جوجه های SPF یک روزه موجب آنمی آپلاستیک می شود. 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 واکسن های آلوده منتقل می شود. در ایران نیز شواهد سرولوژیک آن به اثبات رسیده و به وسیله آزمایش PCR وجود ژنوم آن تائید 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 می سازد. بیماری ناشی از این ویروس به دو شکل کلینکی و تحت کلینیکی است و با توجه به ضررهای اقتصادی زیادی که به سبب عفونت در جوجه های با سن 2- 4 هفته ایجاد می کند نمی توان از آن چشم پوشی کرد. علائم بیماری شامل کم خونی آپلاستیک و آتروفی بافت های 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 ماهیچه ای که گاهی با کم خونی شدید همراه می شود که با دخالت سایر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

عفونتهای ویروسی، باکتریال، یا قارچی به وخامت می گراید (شکل 1) . (15).

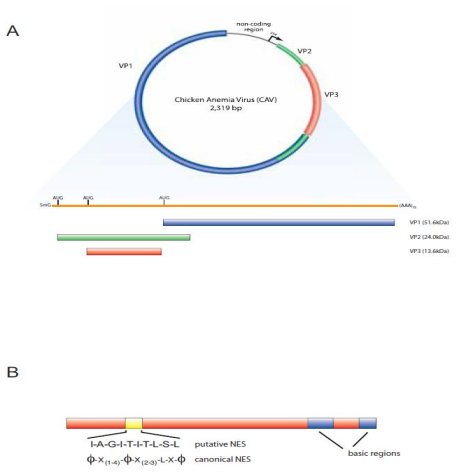


شکل 1. اثرات CAV بر روی سلول های لنفوئیدی و هموسایتوبلاست. CAV هموسایتوبلاست ها و پیش سازهای سلول T را در مغز استخوان آلوده می کند. عفونت این سلول ها منجر به مرگشان می شود و بنابراین منجر به کاهش گلبول های قرمز،هتروفیلها، ترمبوسیت ها وسلولهای T می شود (Adair, 2000).

مرفولوژی ویروس CAV

CAV،20 وجهی با متوسط قطر 25-5/26 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 (شکل2) که همه اینها از یک رونوشت (polycistronic and polyadenylated) بوسیله عناصر پروموتر و افزاینده در بالادست ناحیه شروع رونویسی، ترجمه می شوند. پروتئین های ویروسی; شامل VP1(51 kDa) پروتئین کپسید، VP2(24 kDa)فسفاتاز، سومین VP3 به وزن 13,6 کیلو دالتون همراه با هسته سلولهای عفونی است ولی در اجرام ویروسی تخلیص شده وجود ندارد و پروتئنی غیر ساختمانی است. وجود کامل و بی نقص هر سه این پروتئین ها برای چرخه زندگی عفونی ویروس لازم است (شکل 2) (17، 15).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

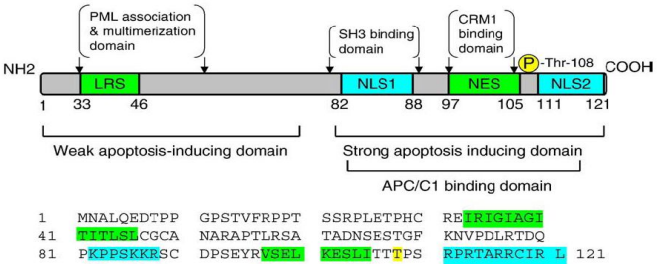


شکل 2. ویروس کم خونی عفونی ماکیان (Chicken Anemia Virus (CAV). (A) **این دیاگرام ژنوم** DNA **تک رشته ای حلقوی** CAV **را نشان می دهد. رونویسی از ناحیه ای مجزایی (**bp**354) در پائین دست** noncoding Region **شروع می شود و تولید** mRNA ، polycistronic, polyadenylated **می کند. ترجمه از کدون های شروع جایکزین 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 **احتمالا عملکردشان تسهیل ورود به هسته می باشد.**

پروتئین آپوپتین به وسیله ژن VP3 ویروس کد می شود و یک محرک قوی برای مرگ سلولها ی تیموس و رده های سلولی لمفوبلاستوئید جوجه است . آپوپتین از 121 اسید آمینه تشکیل شده و توالی سکانس آن همولوژی قابل ملاحضه ای با پروتئین های شناخته شده سلولی ندارد. قسمت انتهای C آپوتین شامل یک سکانس(توالی) لوکالیزاسیون دوقسمتی هسته ای(bipartite sequence (NLS) nuclear localization) می باشد. محدوده NLS1 از اسید آمینه 82 -88 و محدوده NLS2 اسید امینه های باقیمانده 111-121 است (Danen-Van Oorschot, 2003). مضافا، آپوپتین واجد یک سکانس خروج از هسته فرضی export sequence putative nuclear (NES) در باقیمانده اسید امینه 75-105 می باشد. این سکانس شناسایی سبب حرکت رفت و آمدی آپوپتین به درون و بیرون از هسته می شود(شکل3). همچنین آپوپتین یک قطعه لنگرگاه کوچک غنی از لوسین هیدروفوبیک دارد (از اسید امینه 33 – 46) که برای ارتباط خود پروتئین و نیز اتصال به پروتئین پرومیلوسیتیک لوسمی و شرکای واکنشی اش 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 آپوپتوز می شود (19، 17). پروتئین آپوپتین به طور اختصاصی باعث آپوپتوز 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 آپوپتیتن سیتوپلاسمی است اما در سلول های ترانسفورمه شده این پروتئین در هسته لوکالیزه می شود. لوکالیزه شدن آپوپتین در هسته به طور گسترده ای توسط فسفریله شدن آن تنظیم می شود. البته انتقال هدف دار آپوپتین به درون هسته جهت القای آپوپتوز کافی به نظر نمی رسد. آپوپتین 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

شده اند و به نظر می رسد برای لوکالیزاسیون هسته ای یا سایتوتوکسیسیتی اختصاصی توموری آن ضروری هستند (20).

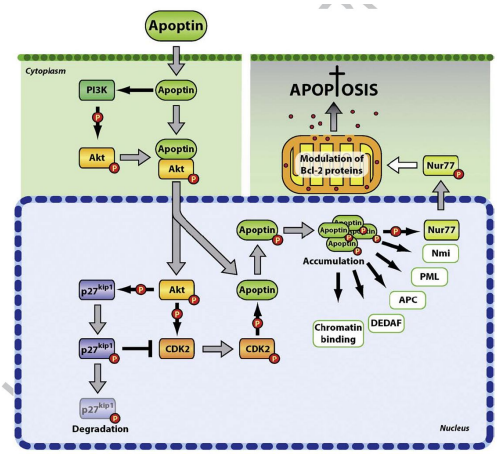


شکل3. ساختار اولیه آپوپتین. دومین های کلیدی و سکانس های مهم نشان داده شده اند. در پائین شکل سکانس آپوپتین را می بینید.(UniProtKB/Swiss-Prot entry P54094)**. آمینو اسیدهایی که با رنگ های سبز و آبی هستند نشان دهنده دومین در بالای شکل می باشند. برای فهم جزئیات می توانید به متن مراجعه کنید.**

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، عموما به وسیله سیستئین پروتئازهای 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 های مسیر میتوکندریایی (نظیرApaf-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 لنفوبلاستوئیدانسانی و سلول استئوسارکومای 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 آپوتین 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).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]



شکل4. 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.

انتقال هسته ای آپوپتین- ضروری برای فعالیت آپوپتوز ی آپوپتین

داده های تجربی نشان می دهد که رفت و آمد هسته ای- سیتوپلاسمی آپوپتین بوسیله هر دوقسمت NLS و انتهای NES N 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 (شکل3). 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) است که مجاور NES است. به نظر می رسد که فسفوریلاسیون 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 نوترکیب

8.تخلیص پروتئین نوترکیب تولید شده

9.بررسی پتانسیل سایتوتوکسیسیتی پروتئین بر روی سلول های لاین سرطانی استاندارد با روش هایی نظیر ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ ایمونوفلورسانت 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

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) منحصرا 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 اپوپتوز 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 معنادرای میزان سلول های آپوپتوتیک را در مقایسه با تاثیر هر کدام از اینها به تنهایی افزایش داده است (25، 24). 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

تزریق جداگانه آدنوویروسی که پروتئین آپوپتین 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 آپوپتین بوده منجر به القای معنی دار آپوپتوز در سلول های هپاتوما و همچنین به شکل کارامدی 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 آپوپتین 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 آپوپتین پروتئین های اختصاصی ضد تومور دیگری نیز شناسایی شده اند که تاثیرات شگرفی در طراحی نسل آینده داروهای ضد سرطان خواهند 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 آپوپتین، پروتئین TTV apoptosis-inducing protein (TAIP) از ویروس Torque teno virus (TTV) ، پروتئینHAMLET (human α-lactalbuminmade lethal to tumor cells) که تا اندازه ای عملکردی شبیه آپوپتین داشته و از شیر انسان جدا شده است، اشاره کرد (20).

آپوپتین و سایرپروتئین های نوترکیب 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 خواهندکاست.

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.

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

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 survivinas anovel approachincancer 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]

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

Ranjbar M.M[1], Mousavi Nasab S.D[2], Ahmadi N[3], Basati Gh[4]*

(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 adition they have adverse effects on normal cells. According to the new kwnowlege 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 Behshti Universuty of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Dept of Clinical Biochemistry, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
**(corresponding author)*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2025-01-15]