بررسی مهار رگزایی به وسیله فیوژن پروتئین GST-PAP

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۱۲/۲۴

محمدرضا قرائتی[۱]
منوچهر میرشاهی[۱*]
مجید صادقی‌زاده[۲]

۱- گروه بیوشیمی
۲- گروه ژنتیک

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، بخش زیست‌شناسی

*نویسنده مسئول، تهران، دانشگاه تربیت مدرس دانشکده علوم پایه، بخش زیست‌شناسی، گروه بیوشیمی
تلفن: ۸۲۸۸۴۴۰۸
email: mirshahi@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های سرطانی برای رشد و تقسیم به غذا نیازمندند. بنابراین برای درمان سرطان یکی از روش‌های مهم و امیدوار کننده استفاده از مهارکننده‌های رگزایی است که رشد تومور و متاستاز سلول‌های سرطانی را متوقف می‌کنند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که Plasminogen related protein-B دارای اثرات ضد توموری است. با توجه به شباهت این پپتید با Preactivation peptide پلاسمینوژن (PAP)، اثرات ضد رگزایی PAP در مدلی آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت. ***روش بررسی:*** قطعه DNA بیان‌کننده PAP به کمک PCR از ژن پلاسمینوژن انسانی در حامل pGEX-2T همسانه‌سازی شد و در باکتری *Escherichia coli* به صورت متصل با GST (Glutathione S-transferase) بیان گردید، سپس Refolding پروتئین حاصل (GST-PAP) انجام گرفت و پروتئین مذکور با رزین GSH-Sepharose تخلیص شد و روی یک مدل رگزایی با استفاده از ماتریژل بررسی گردید. ***یافته‌ها:*** پس از تایید صحت پروتئین خالص شده با روش‌های SDS-PAGE و ایمنوبلاتینگ، بر اساس نتایج حاصل از سنجش رگزایی در سیستم ماتریژل مشخص شد که GST-PAP رگزایی را متوقف و مهار می‌کند. طبق این اطلاعات همبستگی بسیاری بین غلظت اعمال شده از GST-PAP و مهار رگزایی وجود دارد که به صورت کاهش طول ساختارهای مویرگی شکل و تعداد توبول‌ها مشخص می‌شود. مهار رگزایی در غلظت‌های بالای ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل معنی‌دار هستند. ***نتیجه‌گیری:*** براساس یافته‌های این مطالعه GST-PAP در سیستم ماتریژل توانایی مهار تشکیل شبکه سلول‌های آندوتلیال را داراست. این نتایج می‌تواند تاییدی برای فرضیه مهار رگزایی توسط PAP باشد. لذا این پپتید می‌تواند نامزدی برای مهار رگزایی محسوب شود.

کلمات کلیدی: پلاسمینوژن، Preactivation peptide (PAP) ، رگزایی، بیان پروتئین

مقدمه

رگزایی (Angiogenesis) فرایندی است که در طی آن از رگ‌های موجود، رگ‌های جدید به‌وجود می‌آیند. فرایند رگزایی در بسیاری از پدیده‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک اهمیت عمده‌ای دارد.[۱] در بزرگسالان رگزایی به صورت فیزیولوژیک در پدیده‌هایی همچون ترمیم بافت‌های آسیب دیده مشاهده می‌شود. علاوه بر این رگزایی در برخی از پدیده‌های پاتولوژیک از جمله آرتریت روماتوئید و سرطان‌ها نیز نقش مهمی دارد. به عنوان نمونه در سرطان رگزایی فرایندی کلیدی در رشد تومورها و متاستاز سلول‌های سرطانی است،[۲] به گونه‌ای که تکثیر سلول‌های آندوتلیال تومور ۲۰ تا ۲۰۰۰ برابر سریع‌تر از سلول‌های آندوتلیال طبیعی در افراد بالغ است.[۳] مهمترین عامل آغاز کننده رگزایی کاهش موضعی اکسیژن در ناحیه تومور است که اصطلاحاً Tumor Hypoxia نامیده می‌شود. این فرایند منجر به القاء بیان دسته‌ای از ژن‌ها می‌گردد.[۴] از جمله این ژن‌ها می‌توان انواعی از سیتوکین‌ها را نام برد.[۱] سلول‌های توموری به کمک بیان این ژن‌ها و سیتوکین‌ها سبب تحریک سلول‌های آندوتلیال می‌گردند، در این حالت سلول‌های آندوتلیال مهار تماسی خود را از دست می‌دهند و به کمک مهاجرت، تکثیر و تمایز رگ‌های جدیدی را به وجود می‌آورند.[۵] فاکتورهایی همانند Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) و Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) از جمله مهمترین عوامل فعال‌کننده رگزایی هستند.[۶] برای مهاجرت سلول‌های آندوتلیال وجود آنزیم‌هایی جهت هضم ماتریکس خارج سلولی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

(Extracellular matrix) لازم است. این آنزیم‌ها توسط پاره‌ای از سلول‌ها از جمله سلول‌های آندوتلیال و فیبروبلاست به صورت پیش آنزیم ترشح می‌شوند و پس از فعال شدن به‌طور اختصاصی اجزاء ماتریکس خارج سلولی را هضم می‌کنند[1] و به سلول‌های آندوتلیال امکان گسترش می‌دهند. علاوه بر این مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های زاینده آندوتلیال (progenitor endothelial cells) از مغز استخوان وارد جریان‌خون محیطی می‌شوند و طی فرایند Vasculogenesis در ایجاد رگ‌های جدید شرکت می‌کنند.[7] سلول های زاینده آندوتلیال جمعیتی تمایز نایافته هستند و توانایی تقسیم و تمایز دارند. در هر حال رگ‌های جدید چه از رگ‌های موجود تشکیل شوند و چه از طریق سلول‌های زاینده ایجاد گردند، علاوه بر تأمین نیازهای متابولیکی سلول‌های سرطانی، به عنوان راهی برای تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی به‌بافت‌های دیگر نیز عمل می‌کنند. از آنجا که تهاجم سلول‌های سرطانی و متاستاز آنها به بافت‌های دیگر خطرناکترین جنبه سرطان محسوب می‌شود،[8] مهار ایجاد رگ‌های جدید بسیار مهم و حیاتی است. پلاسمینوژن در شکل اولیه خود در ناحیه انتهای آمینی دارای پپتیدی به نام Preactivation Peptide یا PAP است که از لحاظ ساختاری مشابه Plasminogen Related Protein-B (PRP-B) می‌باشد.[9] PAP پس از فعال‌شدن پلاسمینوژن، با هضم پروتئولیتیکی جدا می‌شود. مطالعات پیشین نشان می‌دهند علاوه بر اثرات ضد رگزایی PRP-B،[10] سایر قطعات مشتق از پلاسمینوژن مانند کرینگل‌های ۳-۱ و ۴-۱ (آنژیوستاتین)[11] و کرینگل پنج[12] نیز در مهار رگزایی نقش دارند. تا کنون نقش PAP پس از آزاد شدن از پلاسمینوژن مشخص نشده است. در تحقیق حاضر توانایی PAP در مهار رگزایی مورد توجه قرار گرفت.

روش بررسی

برای بیان PAP از باکتری *Escherichia coli* سویه BL21(DE3) و سیستم بیانی pGEX-2T (از شرکت Pharmacia) استفاده شد. مواد شیمیایی و مورد نیاز برای تهیه محیط کشت از شرکت‌های Sigma و Merck تهیه گردیدند. آنزیم‌های مورد استفاده نیز از شرکت سیناژن خریداری شدند. به منظور به‌دست آوردن ژن رمز دهنده PAP از روش Polymerase Chain Reaction (PCR) استفاده شد. برای این‌کار ابتدا دو پرایمر با ترادف‌های 5'- PAP-forward, GCGCGGATCCGAGCCTCTGGATGACTATGTGAATA-3' و- PAP reverse, 5'-GCGCGGATCCCTACTCTGAGAGATACACTTTCTT-TTCA-3' طراحی شدند. این پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که جایگاه برش برای آنزیم برشگر *Bam*HI داشته باشند. پلاسمید بیانی pGEX-2T نیز در جایگاه همسانه سازی خود دارای جایگاه *Bam*HI می‌باشد که همسانه‌سازی از طریق همین جایگاه انجام شد. ناحیه‌ای که این پرایمرها از روی cDNA ژن پلاسمینوژن همسانه‌سازی می‌کنند پپتیدی ۸۳ آمینواسیدی را رمزدهی می‌کند. PCR در محیط‌های واکنشی ۵۰µl شامل pH۸/۳ ،KCl ۵۰mM ،Tris-HCl ۱۰mM، dNTPs۲۵۰µM ،MgCl2 ۱/۵mM و ۰/۵µl از هر یک از پرایمرها و ۱µl از cDNA پلاسمینوژن به عنوان الگو انجام شد. فرایند PCR شامل یک مرحله واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۴°C به مدت پنج دقیقه و ۳۵ سیکل متشکل از ۶۰ ثانیه دمای ۹۴°C، ۶۰ ثانیه دمای ۶۹°C و ۶۰ ثانیه دمای ۷۲°C بود و در خاتمه به منظور کامل شدن قطعات ناقص نمونه‌ها پنج دقیقه در دمای ۷۲°C قرار گرفتند. بدین ترتیب ژن PAP از روی cDNA پلاسمینوژن انسانی جدا شد. این قطعه به وسیله آنزیم *Bam*HI مورد هضم قرار گرفت. به دلیل تعبیه جایگاه‌های برش برای آنزیم *Bam*HI پس از برش توسط این آنزیم دو انتهای چسبناک در دو سر قطعه به وجود آمد. پلاسمید بیانی نیز به وسیله آنزیم *Bam*HI برش داده شد و قطعه فوق در این پلاسمید همسانه‌سازی گردید تا پلاسمید نو ترکیب pGEX-2T-PAP ایجاد شود. سپس این پلاسمید با استفاده از روش کلرید کلسیم سرد به درون سلول باکتری انتقال داده شد. پلاسمید فوق دارای ژن آنزیم Glutathione S-Transferase یا GST نیز می‌باشد که این پروتئین به همراه PAP به صورت فیوژن پروتئین بیان می‌شود. برای همسانه‌سازی و ایجاد باکتری نوترکیب از تکنیک‌های عمومی همسانه‌سازی بهره گرفته شد.[13] به منظور بیان و تخلیص GST-PAP، باکتری‌های حاوی پلاسمید در محیط LB (تریپتون ۱٪، عصاره مخمر ۰/۵٪، NaCl ۱٪) دارای آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰µg/ml در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. هنگامی که OD600nm در محیط کشت به حدود ۰/۶ رسید، بیان پروتئین با افزودن Isopropyl-thio-galactoside (IPTG) با غلظت نهایی ۰/۵mM به محیط کشت القاء شد. باکتری‌ها به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷°C تحت شرایط القاء قرار گرفتند. پس از این زمان باکتری‌ها به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

وسیله سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۵۰۰g، در دمای ۴°C رسوب داده شدند. باکتری‌های رسوب داده شده با PBS (KCl ۲/۷mM، NaCl ۱۴۰mM، KH2PO4 ۱/۵mM، Na2HPO4 ۱۰mM) شستشو داده شدند و همانند شرایط سانتریفوژ پیشین بار دیگر رسوب داده شدند. سپس باکتری‌ها در PBS سرد در ظرف یخ مورد سونیکاسیون قرار گرفتند. سونیکاسیون طی ۱۰ مرحله ۳۰ ثانیه‌ای با یک دقیقه فاصله بین هر مرحله انجام شد تا دیواره باکتری‌ها تخریب شود و پروتئین‌های باکتریایی آزاد شود. پس از سونیکاسیون پروتئین‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰g و دمای ۴°C درجه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل دارای Inclusion Body (Ib)های حاوی GST-PAP بود. این رسوب در ۱۰ml بافری حاوی ۲۰mM pH ۷/۵mM Tris-HCl، ۲mM Urea دو بار شستشو داده شد. Ib شسته شده در ۱۰ml اوره ۸M حل شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد. پس از این مدت محلول پروتئین در ۷۰۰۰g و در دمای ۴°C رسوب داده شد و محلول رویی جدا گردید. این محلول به آرامی و به ۵۰۰ml بافر بازسرشتگی (Refolding) متشکل از گلیسرول ۲۰ درصد V/V، در PBS افزوده شد. پس از پایان رقیق‌سازی، ذرات معلق موجود در محلول به وسیله سانتریفوژ با شرایط فوق حذف شد. پروتئین‌های موجود در محلول به وسیله سولفات آمونیوم ۹۰ درصد اشباع رسوب داده شدند و پس از سانتریفوژ رسوب حاصل در PBS حل شد و در PBS به مدت ۲۴ ساعت با دو بار تعویض بافر، دیالیز گردید. محلول پروتئینی پس از بازسرشتگی و تغلیظ و دیالیز به وسیله رزین GSH-Sepharose (از شرکت Pharmacia) تخلیص شد. بدین منظور ۱۰mlاز رزین GSH-Sepharose در ستون ریخته شد و با پنج حجم PBS به تعادل رسید. سپس محلول پروتئینی از روی ستون عبور داده شد. پس از آن ستون با سه حجم PBS شستشو داده شد. در نهایت ستون با ۵۰mM GSH در PBS شستشو داده شد تا GST-PAP به صورت خالص از ستون جدا شود. آنالیز SDS-PAGE و ایمونوبلاتینگ: مراحل مختلف کار و تخلیص پروتئین مورد نظر (GST-PAP)به‌وسیله SDS-PAGE بررسی شد. برای اینکار از ژل ۱۲/۵ اکریل آمید و رنگ‌آمیزی کوماسی بلو استفاده شد. به‌منظور اثبات ماهیت PAP از روش ایمنوبلاتینگ استفاده شد. پس از الکتروفورز نمونه‌ها، پروتئین‌ها به روی کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شدند. پس از مسدودسازی به وسیله آلبومین سرم گاو، کاغذ نیتروسلولز به مدت یک ساعت در معرض آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 با غلظت ۶µg/ml در PBS حاوی آلبومین سرم گاو ۰/۱٪ و Tween 20 ۰/۰۵٪ قرار گرفت. این آنتی‌بادی منوکلونال ناحیه PAP از مولکول پلاسمینوژن را شناسایی می‌کند.[۱۴] پس از شستشوی مجدد، کاغذ نیتروسلولز در مجاورت آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی علیه IgG موش) با رقت ۱/۲۰۰۰ که با پراکسیداز (HRP) نشاندار شده بود قرار داده شد. پس از دو ساعت مجاورت و پس از آن شستشو آشکارسازی به وسیله ۱- کلرو ۴- نفتول صورت گرفت. به‌منظور بررسی رگزایی از روش سنجش رگزایی در ماتریژل استفاده شد.[۱۵] برای انجام این آزمایش ابتدا سطح چاهک‌های کشت سلول به وسیله ماتریژل پوشانده شد و به مدت یک ساعت در ۳۷°C قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به چاهک‌های فوق انتقال یافتند و به مدت یک ساعت در ۳۷°C قرار داده شدند. سپس GST-PAP با غلظت‌های ۲۰۰ µg/ml، ۱۰۰ µg/ml، ۵۰ µg/ml، ۲۵ µg/ml و ۱۲/۵ µg/ml به چاهک‌ها اضافه گردید. وضعیت سلول‌های هر چاهک پس از ۱۸ ساعت تیمار بررسی شد و از آن عکسبرداری میکروسکوپی به عمل آمد. عکس‌های میکروسکوپی به وسیله نرم افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که نتایج حاصل به صورت کمی بر اساس طول ساختارهای شبه مویرگی و تعداد توبول‌ها محاسبه شد. این آزمایش سه بار تکرار گردید و میانگین طول ساختارهای شبه مویرگی و تعداد توبول‌ها طی سه مرحله آزمایش در برنامه Microsoft office Excel محاسبه شده و با کمک همین نرم افزار نمودارها رسم و در مقاله ارائه گردیده است. علاوه بر این به کمک نرم افزار فوق انحراف معیار داده‌ها نیز مشخص شد و نتایج با کمک آزمون t-test ارزشیابی شدند.

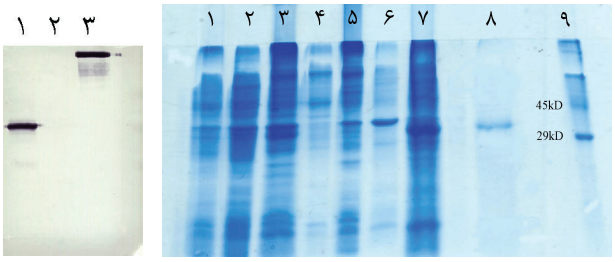
یافته‌ها

در این پژوهش ابتدا ترادف بیان‌کننده PAP به کمک روش PCR از روی cDNA پلاسمینوژن انسانی تکثیر شد و در پلاسمید بیانی pGEX-2T همسانه‌سازی گردید. بدین ترتیب پلاسمید نوترکیب pGEX-2T-PAP حاصل گردید. پلاسمید بیانی pGEX-2T دارای ترادف GST نیز می‌باشد که در ناحیه انتهای آمینی پروتئین نوترکیب بیان می‌شود. با انتقال پلاسمید مذکور به باکتری BL21 و القاء بیان، پروتئین GST-PAP ایجاد می‌شود. بیان این پروتئین در باکتری به صورت Ib انجام می‌گیرد. به‌منظور استفاده از این پروتئین در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

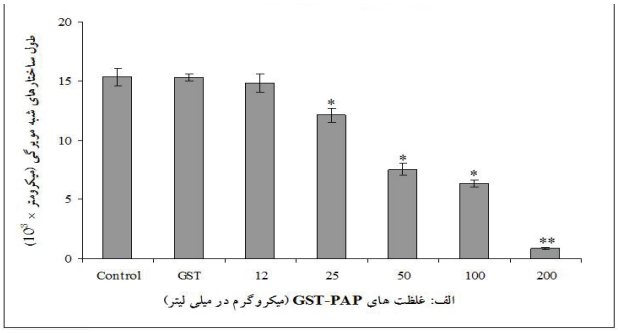
فرایندهای آزمایش باید آن را به صورت طبیعی خود بازگرداند. برای اینکار از حل کردن Ib ها در اوره ۸M و بازسرشته نمودن آن با رقیق‌سازی در بافر حاوی گلیسرول استفاده شد. پروتئین PAP حدود ۹ کیلو دالتون و GST حدود ۲۶ کیلو دالتون وزن دارد. در مجموع پروتئین نوترکیب GST-PAP باید وزنی در حدود ۳۵ کیلو دالتون داشته باشد. بررسی‌های انجام شده با کمک الکتروفورز SDS-PAGE وزن تقریبی این پروتئین را تأیید می‌کند. مراحل متفاوت بیان و تخلیص پروتئین GST-PAP در شکل ۱ – الف آمده است.

به دلیل اتصال GST به PAP می‌توان در خالص‌سازی این پروتئین نوترکیب از رزین GSH-Sepharose استفاده کرد. در این تحقیق از تمایل اتصال GST به سوبسترای خود یعنی GSH بهره گرفته شد تا عمل خالص‌سازی با سهولت بیشتری انجام گیرد. مطالعات پیشین نشان داده بود که آنتی‌بادی منوکلونال A1D12 به صورت اختصاصی به ناحیه انتهای آمینی پلاسمینوژن یا همان PAP متصل می‌شود.[۱۴] بنابراین از این آنتی‌بادی برای شناسایی PAP استفاده شد. آزمایش ایمنوبلاتینگ نشان داد که PAP در نمونه نهایی موجود می‌باشد (شکل ۱– ب). آزمایش‌های انجام شده با استفاده از روش سنجش رگزایی در ماتریژل به وضوح نشانگر اثر مهاری GST-PAP بر روی سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت می‌باشد. در غلظت‌های بالاتر GST-PAP تشکیل ساختارهای شبه مویرگ توسط سلول‌ها مهار شده است. حال آنکه در غلظت‌های پایین GST-PAP و همچنین در نمونه کنترل تعداد و ضخامت ساختارهای شبه مویرگی تشکیل شده به مراتب بیشتر می‌باشد. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار به مقادیر کمی تبدیل شد. این داده‌ها بر اساس طول ساختارهای شبه مویرگی و نیز تعداد توبول‌های تشکیل شده در شکل ۲ ارائه شده است. بر طبق این اطلاعات همبستگی بسیار زیادی بین غلظت اعمال شده از GST-PAP و مهار رگزایی وجود دارد و مهار رگزایی در غلظت‌های بالای ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر نسبت به کنترل معنی‌دار هستند. PAP در غلظت‌های ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($p<۰/۰۵$) و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($p<۰/۰۰۱$) از رشد ساختارهای مویرگی شکل جلوگیری می‌کند. همچنین در غلظت‌های ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ($p<۰/۰۵$) و در غلظت ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ($p<۰/۰۰۱$) تعداد توبول‌ها در سیستم سنجش رگزایی در ماتریژل را کاهش می‌دهد (شکل ۲).

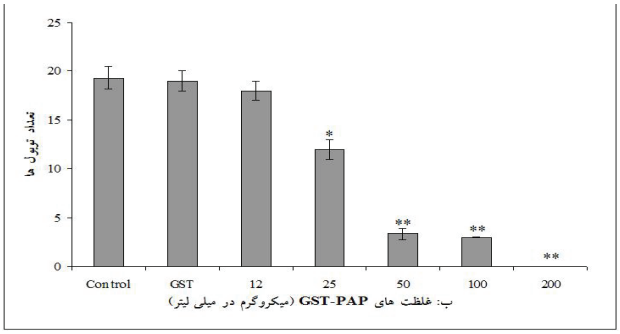


شکل– ۱: (الف) ژل SDS-PAGE شامل مراحل بیان تا تخلیص GST-PAP: (۱) کنترل منفی (باکتری BL21)، (۲) باکتری BL21 حاوی پلاسمید pGEX-PAP القاء نشده، (۳) باکتری BL21 حاوی پلاسمید، القاء شده حل شده در SDS، (۴) پروتئین‌های پریپلاسمیک باکتری نوترکیب، (۵) مایع رویی باکتری BL21 حاوی پلاسمید، القاء شده، پس از سونیکاسیون، (۶) باکتری BL21 حاوی پلاسمید، القاء شده رسوب پس از حل در Urea 8M، (۷) باکتری BL21 حاوی پلاسمید، القاء شده پروتئین‌های محلول در Urea 8M، (۸) GST-PAP تخلیص شده با ستون GSH-Sepharose، (۹) مارکر وزن مولکولی و (ب) آشکارسازی GST-PAP با روش ایمنوبلاتینگ توسط آنتی‌بادی A1D12: (۱) پلاسمینوژن (کنترل مثبت)، (۲) باکتری BL21 (کنترل منفی) و (۳) GST-PAP.

سنجش رگزایی در ماتریژل برای GST- PAP

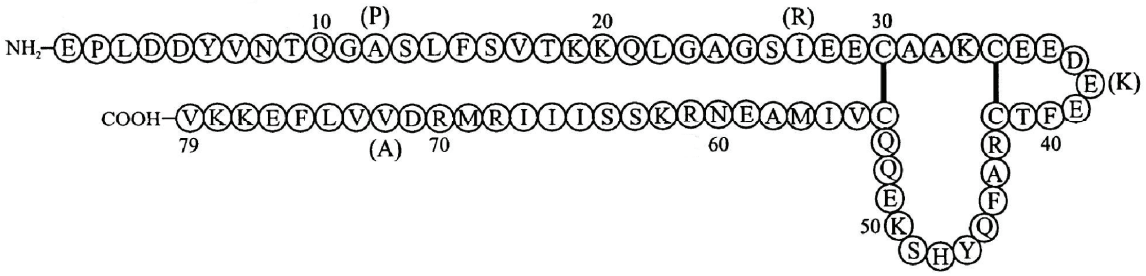


سنجش رگزایی در ماتریژل برای GST- PAP



شکل– ۲: اثر غلظت‌های مختلف GST-PAP (الف) در اندازه ساختارهای مویرگی شکل و (ب) در تعداد توبول‌ها در سیستم سنجش رگزایی در ماتریژل. مقادیر در هر نقطه بیانگر میانگین نتایج سه بار آزمایش±انحراف معیار هستند. $p<۰/۰۵$* و $p<۰/۰۰۱$ نسبت به کنترل است.**

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]



شکل- ۳: ساختار اول PAP و PRP-B. ترادف آمینواسیدی PAP در شکل مشخص شده است. آمینواسیدهایی که در داخل پرانتز آمده‌اند. آمینواسیدهایی هستند که در PRP-B جایگزین شده‌اند. شباهت این دو به حدی است که تنها در چهار آمینواسید تفاوت دارند.

بحث

در سال‌های اخیر مشخص شده است که مهار رگزایی در درمان بیماری‌های مرتبط با رگزایی می‌تواند اثرات مثبتی به همراه داشته باشد.[۱۶] در حال حاضر امیدواری زیادی برای استفاده از مهارکننده‌های رگزایی در درمان سرطان به‌وجود آمده است. این مهارکننده‌ها به کمک کاهش یا قطع تامین نیازهای متابولیسمی سلول‌های سرطانی از یک سو و مهار متاستاز و تهاجم سلول‌های سرطانی از سوی دیگر افق تازه‌ای را در درمان سرطان در مقابل چشم پژوهشگران گشوده‌اند. نکته بسیار مهم دیگر در درمان سرطان با روش‌های شیمی درمانی، مقاومت اکتسابی تومور به این گونه داروها است که این مساله مشکل عمده‌ای را در درمان سرطان به وجود آورده است. از آنجا که میزان جهش و ناپایداری ژنتیکی در سلول‌های سرطانی بسیار بالاست، تغییرات در آنها به سرعت انجام می‌گیرد و نسبت به داروها مقاومت پیدا می‌کنند. اما سلول‌های آندوتلیال سلول‌هایی طبیعی هستند که از نظر ژنتیکی پایدار بوده، میزان جهش در آنها بسیار پایین است. بنابراین مهار رگزایی که با سرکوب سلول‌های آندوتلیال انجام می‌شود باعث ایجاد مقاومت دارویی نمی‌گردد یا مقاومت بسیار کمی ایجاد می‌کند.[۱۷] مهار رگزایی نه تنها در مورد سرطان‌ها بلکه در مورد بسیاری از بیماری‌های دیگر از جمله آرتریت رماتوئید و رتینوپاتی دیابتی و حتی در مواردی از چاقی نیز می‌تواند کارایی داشته باشد. با همین دیدگاه بسیاری از شرکت‌های دارویی بر روی مهار کننده‌های رگزایی سرمایه گذاری وسیعی داشته‌اند و در حال حاضر ترکیبات زیادی در مراحل مختلف آزمایشگاهی و برخی در مراحل آزمایش‌های کلینیکی قرار دارند. قطعات مختلف پلاسمینوژن مانند آنژیوستاتین در میان مهار کننده‌های مهم رگزایی قرار دارند. یکی از قطعات پلاسمینوژن PAP است که همولوژی بسیار زیادی با PRP-B دارد، به گونه‌ای که این دو پپتید تنها در چهار آمینواسید با یکدیگر اختلاف دارند (شکل ۳). مطالعات نشان می‌دهد که رونویسی ژن PRP-B در بافت‌های سرطانی افزایش می‌یابد.[۹و۱۸و۱۹] علاوه بر این تزریق PRP-B به جانوران مدل آزمایشگاهی که دارای تومور بوده‌اند با کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد تومور همراه بوده است.[۱۰] گذشته از این PRP-B اثر قابل توجهی بر روی مهار سلول‌های آندوتلیال بندناف انسان در حضور فعال‌کننده قوی رگزایی یعنی bFGF دارد.[۲۰] تمامی این نتایج تاییدکننده توانایی PRP-B در مهار رگزایی است.[۱۰] بر این اساس به‌نظر می‌رسید، PAP نیز به دلیل شباهت بسیار با PRP-B، اثر مهار رگزایی داشته باشد. طی مطالعه حاضر، اثر ضد رگزایی این پپتید مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ابتدا PAP به‌صورت فیوژن پروتئین GST-PAP بیان و تخلیص گردید و صحت آن نیز توسط ایمنوبلاتینگ با آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی ضد PAP تایید شد (شکل ۱). سپس اثر مهاری PAP در مدل رگزایی ماتریژل بررسی گردید. نتایج به شکل کاملاً معنی‌دار نشانگر مهار رگزایی در سیستم ماتریژل در غلظت‌های ۲۵μg/ml به بالا بودند (شکل ۲). تاکنون برای توضیح مکانیسم اثر این پپتیدها مدل‌های متعددی ارائه شده است. در مورد PRP-B احتمالا یکی از مکانیسم‌های مهار تومور به وسیله آن، مهار سلول‌های آندوتلیال و شاید کاهش عملکرد سلول‌های ماهیچه صاف در محیط پیش رگزایی باشد.[۲۰] در مورد PAP بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که PAP تنظیم‌کننده فعالیت مهاری پپتیدهای مرتبط با آنژیوستاتین بر روی تکثیر و مهاجرت سلول‌های آندوتلیال است. این اثر از طریق اتصال به کرینگل‌ها انجام می‌شود.[۲۱] اما هنوز به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

بررسی‌های بیشتری دارد.[۲۱] با توجه به نیاز به مهار کننده‌های رگزایی برای درمان بیماری‌ها می‌توان این پپتید را نامزدی برای مهار رگزایی محسوب کرد. البته بدیهی است که هنوز به آزمایش‌های بیشتری از جمله، آزمایش‌های *in vivo* نیاز است. از آنجا که PAP پپتیدی با منشاء انسانی است، کاربرد آن در بدن انسان باعث فعال شدن سیستم ایمنی نمی‌گردد. از سوی دیگر PAP اندازه نسبتا کوچکی دارد که از نظر فارماکولوژیک می‌تواند یک مزیت محسوب شود. توجه به این پپتید، انجام آزمایش‌های تکمیلی دیگر می‌تواند نوید بخش گشوده شدن راه‌های درمانی تازه‌ای برای بسیاری از بیماری‌های مرتبط با رگزایی باشد. *سپاسگزاری:* از مساعدت جناب آقای دکتر پژمان میرشاهی و خانم دکتر J. Soria و خانم دکتر C. Soria پژوهشگران بیمارستان Hôtel Dieu de Paris سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Griffioen A, Molema G: Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. Pharmacol Rev 2000, 52:237-268.
2. Roy S, Khanna S, Alessio HM, Vider J, Bagchi D, Bagchi M, Sen C: Antiangiogenic property of edible berries. Free Rad Res 2002, 36:1023-1031.
3. Denekamp J: Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. Acta Radiol Oncol 1984, 23:217-225.
4. Dachs G, Tozer G: Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. Eur J Cancer 2000, 36:1649-1660.
5. Albini A, Florio T, Giunciuglio D, Masiello L, Carlone S, Corsaro A, Thellung S, Cai T, Noonan D, Schettini G: Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. FASEB J 1999, 13:647-655.
6. Cavallaro U, Tenan M, Castelli V, Perilli A, Maggiano N, Meir EV, Montesano R, Soria M, Pepper M: Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis. J Cell Biochem 2001, 82:619-633.
7. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrowderived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat Med 1999, 5:434-438.
8. Liotta L, Steeg P, Stetler-Stevenson W: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. Cell 1991, 64:327-336.
9. Lewis V, Gehrmann M, Weissbach L, Hyman J, Rielly A, Jones D, Llinas M, Schaller J: Homologous plasminogen N-terminal and plasminogen-related gene A and B peptides Characterization of cDNAs and recombinant fusion proteins. Eur J Biochem 1999, 259:618-625.
10. Lewis V, O'Reilly M, Gehrmann M, Llinas M, Schaller J, Weissbach L: Inhibition of tumor growth by plasminogen-related protein-B. Anticancer Res 2001, 21:2287-2291.
11. O'Reilly M, Holmgren L, Chen C, Folkman J: Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med 1996, 2:689-692.
12. Cao Y, Chen A, An S, Ji R, Davidson D, Cao Y, Llinas M: Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. J Biol Chem 1997, 272:22924–22928.
13. SAMBROOK J, RUSSELL D, SAMBROOK J: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
14. Mirshahi M, Soria J, Lijnen HR, Fleury V, Bertrand O, Drouet L, Caen JP, Soria C: A monoclonal antibody directed against an epitope in the NH2-terminal region of native human plasminogen induces a modification of its functional properties. Fibrinolysis & Proteolysis 1997, 11:155-163.
15. Auerbach R, Lewis R, Shinners B, Kubai L, Akhtar N: Angiogenesis Assays: A Critical Overview. Clinical Chemistry 2003, 49:32–40.
16. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996, 86:353-364.
17. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature 1997, 390:404-407.
18. Tateno T, Ichinose A: Expression of plasminogen-related gene B varies among normal tissues and increases in cancer tissues. FEBS Lett 1999, 445:31-35.
19. Weissbach L, Treadwell BV: A plasminogen-related gene is expressed in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 1992, 186:1108-1114.
20. Morioka H, Morii T, Vogel T, Hornicek F, Weissbacha L: Interaction of plasminogen-related protein B with endothelial and smooth muscle cells in vitro. Experimental Cell Research 2003, 287:166-177.
21. Hayashi M ,Tamura Y, Dohmae N, Kojima S, Shimonaka M: Plasminogen N-terminal activation peptide modulates the activity of angiostatin-related peptides on endothelial cell proliferation and migration. Biochemical and Biophysical Research Communications 2008, 369:635 -640

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 10, Jan 2009: 697-703

Evaluating inhibition of angiogenesis by GST-PAP fusion protein

Gharaati M.R.[1]
Mirshahi M.[1*]
Sadeghi-Zadeh M.[2]

1- Department of Biochemistry
2- Department of Genetics

School of Science, Tarbiat Modares University, Tehran,. Iran

*Corresponding author: Department of Biochemistry, School of Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran
Tel: +98-21-82884408
email: mirshahi@modares.ac.ir

Received: October 23, 2007 Accepted: February 13, 2008

Abstract

***Background*:** Tumor cells need food and oxygen supply for growth and division. Therefore one of the most promising areas of cancer therapy focuses on using agents that inhibit tumor angiogenesis. Inhibition of angiogenesis prevents cell growth, division and metastasis. Previous studies showed that plasminogen related Protein-B has an anti-tumor activity in mice. This protein has a high level of homology with preactivation Peptide (PAP) of human plasminogen. According to this high homology, antiangiogeneic activity of PAP was investigated in an in vitro angiogenesis model.

Methods: PAP encoding region of human plasminogen gene was isolated by Polymerase Chain Reaction and cloned in pGEX-2T vector. This plasmid was expressed in Escherichia coli as a fusion protein (GST-PAP). GST-PAP was expressed as inclusion body and purified by affinity chromatography on GSH-sepharose resin after refolding. antiangiogenic effects of purified protein were surveyed with Matrigel assay.

Results: The GST-PAP was expressed and purified and its accuracy was confirmed by SDS-PAGE analysis and immunoblotting. Microscopic studies showed that GST-PAP inhibited angiogenesis in Matrigel system which is shown by shrinking the length of capillary like structures and a decrease in the number of tubule. While applying concentarations of 25µg/ml of GST-PAP and concentrations above that, antiangiogenic activity of GST-PAP was significant comparing to the controls.

Conclusion: Finding shows that GST-PAP can inhibit network formation in Matrigel system. This findings support the theory that PAP is a potent angiogenesis inhibitor.

Keywords: Plasminogen, Peptide, angiogenesis, protein, expression

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-12]