Journal of Police Medicine

Spring 2014; Vol. 3, No. 1: 51-60

Original Article

Investigation the Effect of an Apaf-1 Derivative on Caspase Activity in HEK293T Cells

Received: 30 January 2014 **Revised:** 3 May 2014 **Accepted:** 7 May 2014

Mohammad Taha Mohammadi Azad[1]
Amin Tashakor[1]
Roohullah Hemmeti[2]
Saman Hosseinkhani[3*]

[1]M.Sc Student, Department of Biochemistry, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Ph.D Student, Department of Biochemistry, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[3]Professor, Department of Biochemistry, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background: Programmed cell death or apoptosis is one of the most important physiological processes involved in development and homeostasis maintenance of multicellular organisms. Every defect in apoptosis regulation leads to wide variety of genetic disorders, autoimmune diseases and cancers. Apoptosis is an essential process in both health and diseases. Apoptosis is defined as morphological changes in a cell undergoing programmed cell death. These changes lead to cell shrinkage, nuclear condensation, membrane intrusion, plasma membrane fractionation and their conversion to apoptotic bodies and changes in cell surface membrane which cause phagocytosis of the cell bearing apoptosis.

Materials and Methods: Apaf-1 gene is mutated using PCR and then transfected into HEK293T cells by lipofectamin. 24 h transfected cells exposed to doxorubicin and caspase 3/7 activity was measured over different times.

Result: Caspase 3/7 activity was observed obviousely in transfected cells, which was 3 fold greater than those of controls. This data demonstrates the increase in caspase 3/7 activity in HEK293T cells. Based on our observation, the terminus domain in Apaf-1 is probably play a role in releasing the caspases.

Conclusion: The results of this study indicated that terminal domain of Apaf-1 has pivotal role in caspase regulation and it is possible to design a biosensor for screening the anticancer drugs by removing terminal domain of this protein.

Keywords: programmed cell death, caspase, apoptosis, apoptosom, cancer

[*]**Corresponding Author:**
Saman Hosseinkhani
Tel: (+98)21 82884407
e-mail: saman_h@modares.ac.ir

بهار۱۳۹۳ – دوره ۳ – شماره ۱– صفحات ۵۱–۶۰

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بررسی اثر یک مشتق از پروتئین Apaf-1 بر فعالیت کاسپاز سلول‌های HEK293T

تاریخ دریافت: ۱۰ بهمن ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۱۳ اردیبهشت ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۷ اردیبهشت ۱۳۹۳

چکیده

محمد طه محمدی آزاد[۱]
امین تشکر[۱]
روح الله همتی[۲]
سامان حسینخانی[۳*]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲]دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۳]استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
سامان حسینخانی
تلفن: ۲۱۸۲۸۸۴۴۰۷(۹۸+)
پست الکترونیک:
saman_h@modares.ac.ir

مقدمه: مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا همان آپوپتوز یکی از مهمترین فرآیندهای فیزیولوژیکی در تکوین و حفظ هموستازی موجودات چندسلولی می‌باشد. هر گونه اختلالی در تنظیم آپوپتوز منجر به ایجاد اختلالات گسترده ژنتیکی، بیماری‌های خود ایمنی و سرطان می‌شود. فرآیند آپوپتوز هم در بحث سلامت و هم در بیماری‌ها ضروری می‌باشد. اصطلاح آپوپتوز به تغییرات مورفولوژیکی یک سلول که درگیر مرگ برنامه‌ریزی شده باشد اطلاق می‌گردد که این تغییرات معمولاً به صورت چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته، برآمدگی‌های سطح غشاء، قطعه قطعه شدن غشاء پلاسمائی و تبدیل شدن آن‌ها به اجسامی به نام اجسام آپوپتوزی و تغییرات سطح غشاء که در نهایت به فاگوسیتوز شدن سلول آپوپتوزی منجر می‌شود.

مواد و روش‌ها: پس از ایجاد جهش هدف دار در ژن Apaf-1 به کمک PCR، سلول‌های HEK293T به کمک لیپوفکتامین ترانسفکت شدند. ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن سلول‌ها در حضور دوکسوروبیسین قرار گرفتند و فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ آن‌ها در زمان‌های مختلف مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ به خوبی در سلول‌های ترانسفکت شده مشاهده شد و این فعالیت حدود ۳ برابر سلول‌های کنترل بود که این داده به خوبی نشان دهنده افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در سلول‌های HEK293T است. با توجه به مشاهده صورت گرفته احتمالاً دومین انتهایی پروتئین Apaf-1 نقش کنترلی بر روی آزادسازی کاسپاز دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد دومین انتهایی پروتئین Apaf-1 فعالیت کاسپازهای سلول را کنترل می‌کند و امکان استفاده از آن به عنوان یک بیوسنسور برای غربالگری داروهای ضد سرطان وجود دارد.

کلید واژه‌ها: مرگ برنامه‌ریزی شده، کاسپاز، آپاپتوز، آپاپتوزوم، سرطان

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا همان آپوپتوز یکی از مهمترین فرآیندهای فیزیولوژیکی در تکوین و حفظ هموستازی موجودات چندسلولی می‌باشد [۳-۱]. اختلال در این فرآیند حیاتی منجر به ایجاد بیماری‌های گسترده‌ای همچون انواع کم‌خونی‌ها، سرطان،

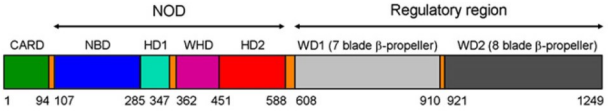
Journal of Police Medicine
Spring 2014; Vol. 3, No. 1: 51-60

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی و بیماری‌های خود ایمنی می‌گردد [۵ و ۴].

پروتئازهایی که وظیفه انتقال پیام را در فرآیند آپوپتوز بر عهده دارند اعضاء خانواده کاسپازها می باشند. نام کاسپاز از عبارت Cys-dependent Asp-Specific protease استخراج شده است که نشان دهنده این است که یک اسید آمینه سیستین حفظ شده در دهانه فعال این پروتئازها وجود دارد و همچنین این پروتئازها به صورت اختصاصی سوبستراهای خود را بعد از اسید آمینه آسپارتیک اسید (Asp) برش می دهد [۶]. شاید آبشار فعال شدن کاسپازها خودش بهترین مثال در رابطه با فعالیت پروتئازی ویژه باشد، به طوری که فعالیت پروتئازی کاسپازهای آغازگر بر روی شکل غیرفعال کاسپازهای اجرایی باعث فعال شدن آن ها می شود [۷]. گیرنده مسیر داخلی آپوپتوز، کمپلکس آپوپتوزم نام دارد که یک گیرنده محلول سیتوپلاسمی می باشد و از اولگیومریزه شدن پروتئینی با نام Apaf1 به وجود می‌آید. در حضور سیتوکروم C و dATP پروتئین Apaf1 جهت تشکیل ساختار چرخ مانند آپوپتوزوم الیگومریزه می‌شود. تشکیل این ساختار یک مرحله اساسی و مهم در فعال شدن کاسپاز-۹ که یک کاسپاز آغازگر می باشد، محسوب می‌شود.

پروتئین Apaf1 یک پروتئین چند دومینی می‌باشد که از سه ناحیه عملکردی مجزا از هم تشکیل شده است؛ دومین CARD که در سمت آمینو پروتئین وجود دارد، دومین WD-40 که در سمت کربوکسیل پروتئین وجود دارد، دومین NOD که در حدفاصل دو دومین فوق‌الذکر وجود دارد. دومین CARD مکانی است که پروکاسپاز-۹ به آن متصل می‌شود، دومین NOD که خود دارای ۴ زیردومین می باشد مسئولیت اولیگومریزه شدن مولکول Apaf1 و تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم را برعهده دارد و دومین تنظیمی WD-40 که از دو زیردومین تشکیل شده و مکان اتصال سیتوکروم c می‌باشد [۹، ۸، ۱].

مطالعات ساختاری انجام شده نشان می‌دهد، که دومین NOD خود از چند زیر واحد تشکیل شده است. شکل ۱ شامل دومین های NBD، دومین HD1، دومین WHD و دومین HD2 می‌باشد [۱۰].



شکل ۱: دومین‌ها و زیر دومین‌های پروتئین Apaf1

در شرایط عدم حضور سیگنال محرک آپوپتوز، پروتئین Apaf1 به شکل مونومری در سیتوپلاسم وجود دارد در این حالت تصور بر این است که دومین‌های WD-40، پروتئین Apaf1 را در یک حالت بسته نگهداری می کنند. بررسی هایی که با روش میکروسکوپ الکترونی بر روی ساختار Apaf1 انجام شده نشان می دهد که دومین‌های WD-40 به سمت عقب برگشته و روی دو دومین دیگر را می‌پوشانند و بدین وسیله Apaf1 را در حالت مونومری قفل شده (Locked form) نگهداری می‌نمایند [۹، ۵، ۳، ۲]. علاوه بر این حالت قرار گیری دومین های WD-40 و موقعیت دو دومین CARD و NOD نیز نسبت به هم طوری می باشد که امکان اولیگومریزه شدن مونومرها فراهم نمی‌باشد [۱۱].

با توجه به کارهای انجام شده در زمینه سنجش آپوپتوز در سایر مطالعات، هنوز روش مشخصی برای بررسی نقش دومین WD-40 در ساختار Apaf1 ارائه نشده است. در این تحقیق دومین انتهایی پروتئین Apaf-1 با ایجاد یک جهش نقطه‌ای و ایجاد کدون پایان حذف شد تا نقش این دومین بررسی شده و در صورت امکان یک بیوسنسور برای غربالگری داروهای ضد سرطان ساخته شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب جهش‌ها

زیر واحد NBD-HD1 از طریق بر همکنش با β-propeller در WDI و زیر واحد WHD-HD2 در NOD در جای خود مستقر می‌باشد. زیرواحد NBD-HD1 می‌تواند آزادانه چرخش کند و این چرخش نواحی لازم برای اولیگومریزاسیون و تغییر محل CARD را فراهم می‌سازد. یکی از مهمترین سوالاتی که مطرح می‌باشد نقش دومین‌های WD-40 در شکل گیری کمپلکس آپاپتوزوم در هنگام اتصال به سیتوکروم c است. در این تحقیق، آمینو اسید ۹۱۲ یعنی لیزین با جابجایی نوکلوتید آدنین به تیمین به رمز پایان تبدیل شد.

طراحی پرایمر

بعد از انتخاب موتاسیون ها، پرایمرهایی با کدون های جدید برای ایجاد کدون پایان و به دنبال آن حذف دومین WD2 طراحی شدند. پرایمـرهای مورد استفاده در واکنش PCR با استفاده از نرم افزار Oligo بر اساس cDNA مولکول Apaf-1 طراحی شدند. به این منظور توالی مورد نیاز از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد و پرایمرهای پیشرو و معکوس که هر دو حاوی جهش بودند از روی این توالی طراحی شدند. نکته مهم این است که رمز پایان دارای سه کدون می باشد که بر طبق جداول موجود از کدون های با درصد

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۳ – دوره۳ – شماره ۱– صفحات ۵۱–۶۰

استفاده بیشتر استفاده گردید. جهش زایی هدفدار از طریق PCR به روش QuikChange انجام شد.

در تمام این مراحل از ژن Apaf-1 کلون شده به عنوان الگو استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ورود رمزهای پایان به ترتیب عبارتند از:

Native:
ACCAGACAATCAGGCTCTGGGAGACAAAGAAAGTATG

Apaf -Forward:
ACCAGACAATCAGGCTCTG**A**GAGACAAAGAAAGTATG

Apaf-Reverse:
CATACTTTCTTTGTCTC**T**CAGAGCCTGATTGTCTGGT

نوکلئوتیدهای که بصورت بولد مشخص شده برای ایجاد جهش با نوکلوتید قبلی جایگزین شده است.

انجام PCR

در ابتدا پرایمرها بصورت لیوفلیزه بوده و براساس برگه اطلاعات شرکت سازنده، میزان مشخصی آب مقطر به هر یک از پرایمرهای پیشرو و معکوس اضافه شد. در این حالت غلظت پرایمرها /pmol ۱۰۰ µl بود اما جهت انجام PCR، یک استوک با غلظت /pmol ۱۰ µl آماده شد. در دو میکروتیوب استریل به ترتیب ۲/۵ میکرولیتر بافر تکثیر ۱۰ X حاوی $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP10mM، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیشرو و معکوس با غلظت pM10 در هریک از میکروتیوب ها، ۰/۵ میکرولیتر از نمونه با غلظت ng/µL ۱۰۰ و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Prime STAR HS DNA polymerase اضافه نموده و حجم نهایی توسط آب دیونیزه استریل در هر میکروتیوب به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. آنزیم Prime STAR HS DNA polymerase علاوه بر داشتن قدرت تصحیح در جهت ´۳ ⟶ ´۵ از نوع Hot start بوده که این خاصیت مانع از فعالیت غیر اختصاصی آنزیم در طی مراحل آماده سازی نمونه می شود. میکروتیوب ها سریعاً به دستگاه ترموسایکلر منتقل شدند و پس از واسرشت اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واکنش PCR به مدت ۶ سیکل با برنامه حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۳ دقیقه انجام گرفت. پس از ۶ سیکل محتویات دو میکروتیوب با یکدیگر مخلوط شد و واکنش با همان شرایط ذکر شده به مدت ۲۴ سیکل ادامه یافت. در نهایت مرحله طویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این روش PCR، تمام طول وکتور تکثیر می‌شود. پس از اتمام واکنش به منظور بررسی کیفی و کمّی قطعه تکثیر شده، ۵ میکرولیتر از محصول PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز بررسی و باقیمانده محصول PCR در دمای۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش هضم با Dpn1

تقریباً، DNA جدا شده از تمامی سوش‌های E. coli و همچنین DNA مورد استفاده در این واکنش بعنوان رشته الگو، بصورت متیله می‌باشند. بعد از انجام PCR به روش QuikChange، به منظور حذف رشته‌های والدی که فاقد جهش مورد نظر می‌باشند، می‌بایست نمونه‌ها با آنزیم Dpn1 تیمار شوند. اندونوکلئاز Dpn1 که توالی نوکلئوتیدی هدف آن 5’-G_{m6}ATC-3’ می‌باشد، رشته‌های متیله DNA را شناسایی نموده و آن‌ها را برش می‌دهد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر محصول PCR با ۲ میکرولیتر آنزیم Dpn1 به مدت یک شب در دمای ۳۷° C تیمار می‌شود.

تهیه باکتری مستعد

ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع تهیه و اتوکلاو شد. در مرحله بعد، یک تک کلون از باکتری XL-10 به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت اضافه و به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱ میلی لیتر باکتری رشد یافته به ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت افزوده شد و تا رسیدن به OD حدود ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از آن باکتری رشد یافته در دور ۴۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل را در حجم ۲۵ ml از ۱۰۰ $CaCl_2$ mM حل نموده و به مدت ۲ ساعت در یخ قرار می‌دهیم. سپس نمونه را مانند قبل رسوب داده و دو مرتبه همین فرآیند تکرار میشود. در نهایت نمونه را مجدداً مانند قبل رسوب داده و به نسبت ۱: ۵۰ به آن ۸۵ mM کلرید کلسیم و گلیسرول ۱۵٪ اضافه نموده و در حجم‌های ۲۰۰ میکرولیتری در C° ۸۰– نگهداری شد.

غربال‌گری کلون‌های مثبت

تأیید مرحله کلونینگ با استفاده از کلونی PCR و نیز هضم توسط آنزیم‌های محدوداثر XhoI و BamHI انجام گرفت. به این منظور ابتدا تعدادی کلونی به صورت اتفاقی انتخاب گردید. چنین کلونی‌هایی به صورت مجزا در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تلقیح شد. ۵ میکرولیتر از باکتری رقیق شده مستقیماً توسط PCR با

Journal of Police Medicine
Spring 2014; Vol. 3, No. 1: 51-60

استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن Apaf-1 بررسی شد. باقیمانده باکتری‌های رقیق شده به ۷ میلی‌لیتر محیط LB منتقل گردید و پس از تهیه استوک در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در ادامه از کلونی‌های تأیید شده توسط PCR پس از رشد در محیط LB با استفاده از کیت GeneAll استخراج پلازمید انجام گرفت. تایید پلازمیدهای نوترکیب با انجام هضم ساده و دوگانه با استفاده از آنزیم‌های XhoI و BamHI انجام گرفت.

هضم پلازمیدهای استخراج شده با آنزیم‌های XhoI و BamHI

از آنجا که قطعه مورد نظر بین جایگاه‌های برش آنزیم‌های XhoI و BamHI کلون شده، به منظور اطمینان از صحت وکتور و قطعه مورد نظر عمل هضم یگانه و دوگانه با این دو آنزیم انجام گرفت. آنزیم BamHI با ویژگی نسبت به توالی (GGATCC) و آنزیم XhoI با ویژگی نسبت به توالی (CTCGAG) بودند. هر دو آنزیم انتهای چسبنده ایجاد می‌کنند. برای انجام واکنش هضم از بافر مشترک FastDigest استفاده گردید. برای هضم یگانه در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری به ترتیب ۵ میکرولیتر از پلازمید استخراج شده و ۱ میکرولیتر آنزیم BamHI، ۲ میکرولیتر بافر Fast 10X و آب استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. به طور مشابه در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری دیگر به میزان ۵ میکرولیتر پلازمید استخراج شده، ۱ میکرولیتر آنزیم XhoI و ۲ میکرولیتر بافر Fast 10X و آب استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شد. تمامی میکروتیوب‌ها در دمای ۳۷° C به مدت ۴ ساعت انکوبه گردیدند و کیفیت فرآیند هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. برای هضم دوگانه، در یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری ۵ میکرولیتر از پلازمید استخراج شده، ۱ میکرولیتر آنزیم BamHI، ۱ میکرولیتر آنزیم XhoI، ۲ میکرولیتر بافر Fast 10X و آب استریل تا حجم ۲۰ میکرولیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷° C انکوبه گردید.کیفیت محصولات استخراج شده با انتقال ۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد و انجام الکتروفورز بررسی شد، در نهایت غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه Nanodrop کمپانی Thermo تعیین گردید.

تعیین توالی cDNA

تعین توالی cDNA وارد شده به درون ناقل برای نمونه Apaf-1 جهش یافته با استفاده از پرایمرهای عمومی راه‌انداز (پروموتور) و ترمیناتور T7 و به روش خودکار توسط شرکت Macrogene کره جنوبی انجام گرفت. توالی cDNA به دست آمده و ردیف پروتئینی و نوکلئوتیدی نمونه وحشی و جهش یافته‌ها با هم مقایسه شدند و جهش‌های وارد شده تأیید گردیدند.

انتقال سازه‌ها به داخل سلول‌های HEK293T

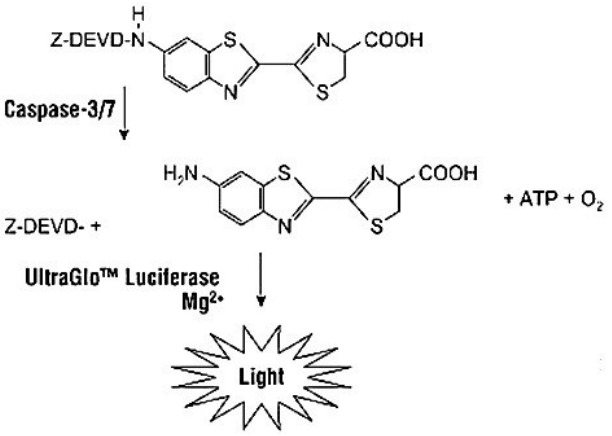
برای انتقال سازه‌ها به داخل سلول‌های HEK293T از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ مربوط به شرکت اینویتروژن استفاده گردید. این روش که هنوز به درستی مکانیسم عمل آن مشخص نشده است به نظر می‌رسد که اتصال DNA به غشاء سلولی را تسهیل می‌کند و باعث ورود DNA به سلول از طریق آندوسیتوز می شود. این روش همچنین به واسطه این که DNA را به صورت رسوب‌های ریز در می‌آورد آن ها را در مقابل نوکئازهای سلولی و سرمی محافظت می‌نماید.

تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم در شرایط درون سلولی

براساس این طراحی سلول بعد از دریافت سازه‌های مورد نظر در شرایط القاء آپوپتوز قرار می‌گرفت و تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم در شرایط درون سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این استراتژی دیگر نیازی به اضافه نمودن سیتوکروم c و dATP نبود بلکه سلول بعد از قرار گرفتن در شرایط آپوپتوز و آزاد شدن سیتوکروم c از داخل میتوکندری، امکان تشکیل این کمپلکس به صورت درون سلولی فراهم می‌گردید و این سنسور قابلیت اندازه گیری میزان آزاد شدن سیتوکروم c دورن سلولی را فراهم می‌کرد. از بین ترکیبات موجود داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین به عنوان القاء کننده آپوپتوز انتخاب گردید.

سنجش فعالیت کاسپاز ۷/۳

سنجش کاسپاز ۷/۳ روشی مشابه با سنجش لومینسانت است که فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ را اندازه‌گیری می کند. این گروه از خانواده



شکل ۲: مکانیسم عمل کیت سنجش کاسپاز

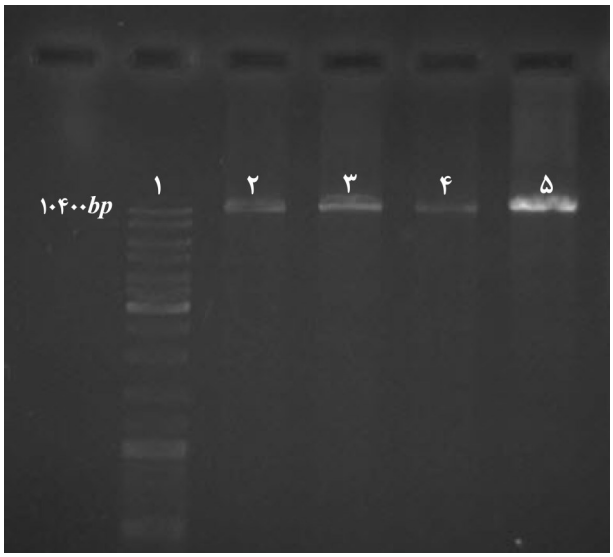
مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۳ – دوره۳ – شماره ۱– صفحات ۵۱–۶۰

سیستئین پروتئازها نقش مهمی را در آپوپتوز در سلول های پستانداران ایفا می کنند. در این روش یک سوبسترای لومینوژن کاسپاز ۷/۳ که واجد یک توالی تتراپپتیدی DEVD است برای سنجش فعالیت کاسپاز، فعالیت لوسیفراز و لیز سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزودن این معرف به لیز سلولی به دنبال آن شکست سوبسترا تحت تاثیر کاسپاز باعث تولید سیگنال لومینسنت توسط لوسیفراز می‌شود. میزان لومینسانس با مقدار فعالیت کاسپاز متناسب می باشد. در این تحقیق جهت انجام سنجش فعالیت کاسپاز ۵ میکرولیتر از لیز سلولی حاصل از بافر هیپوتونیک با ۵ میکرولیتر از معرف ادغام شده و با استفاده از دستگاه لومینومتر میزان نشر نور اندازه گیری شد (شکل ۲).

یافته‌ها

واکنش QuickChange

به منظور بررسی نقش دومین‌های WD1 و WD2 در ساختار و فعالیت Apaf-1 و نقش آن در تشکیل کمپلکس آپاپتوزوم جهش های حذفی در ژن مربوطه انجام شد. برای انجام QuickChange از وکتور دارای قطعه‌ی طبیعی ژن Apaf-1 به عنوان الگو و پرایمرهای جهش زا برای اعمال جهش استفاده گردید. تکثیر قطعات حاصل به منظور یافتن بهترین دمای اتصال پرایمر در دماهای ۶۰، ۶۲، ۶۴ و ۶۶ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت. به این ترتیب بهترین دمای اتصال ۶۶ درجه بدست آمد (شکل ۳).



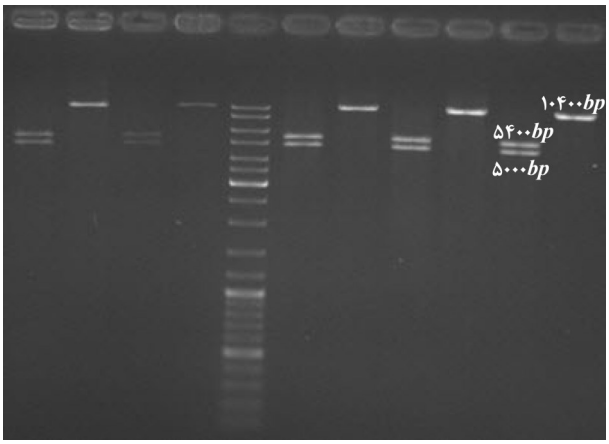
شکل ۳: الکتروفورز ژن Apaf1 در شرایط دمائی متفاوت جهت اتصال پرایمرها با آنزیم PrimStar ۱– اندازه نمای DNA، ۲ –دمای ۶۰ درجه، ۳– دمای ۶۲ درجه، ۴– دمای ۶۴ درجه، ۵– دمای ۶۶ درجه

غربال گری باکتری‌های ترانسفورم شده از طریق کلنی PCR

پس از انتقال محصولات PCR به باکتری های مستعد XL10-GOLD و ظهور کلنی، جهت اطمینان از صحت وکتورهای موجود در کلنی‌ها، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن Apaf-1 انجام شد. با انجام این کار انتظار بر این بود که قطعه‌ای با طول ۳۷۴۷ نوکلئوتید روی ژل مشاهده گردد. در ادامه کلنی‌های صحیح برای انجام تست‌های بعدی انتخاب شدند.

هضم یگانه و دوگانه پلازمیدهای استخراج شده

به منظور تأیید وکتور، با آنزیم BamHI عمل هضم یگانه و با آنزیم های BamHI و XhoI عمل هضم دوگانه انجام شد و قطعات با طول bp4996 مربوط به Apaf1 و bp5428 مربوط به وکتور pcDNA3.1 به‌دست آمد (شکل ۴).



شکل٤: قطعات حاصل از هضم یگانه و دوگانه Apaf1 حاصل از کلنی‌های مختلف

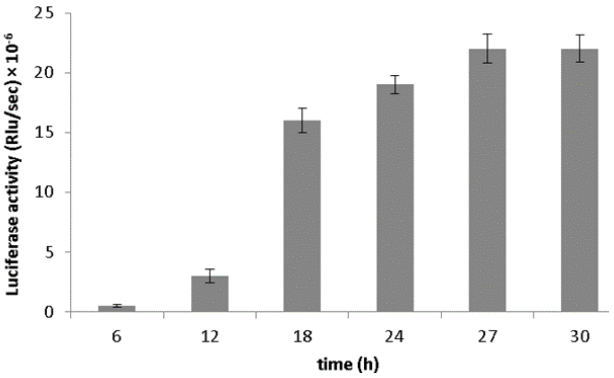
تعیین توال پلازمید

به منظور تعیین توالی پلازمیدهای حاصل از ترانسفورماسیون و تأیید ورود جهش نقطه‌ای به پلازمید، نمونه های پلازمید جهت تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شد. خوانش پلازمیدهای ارسالی با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن Apaf-1 انجام گرفت شایان ذکر است دو جهش مورد نظر روی وکتور انجام پذیرفت.

تعیین ساعت مناسب برای القای آپوپتوز بعد از ترانسفکشن

از آنجا که میزان بیان پروتئین در ساعات مختلف متفاوت است و در مقالات از زمان‌های ۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن برای القای آپاپتوز استفاده شده است، برای پیدا کردن بهترین زمان برای القای

Journal of Police Medicine
Spring 2014; Vol. 3, No. 1: 51-60



نمودار ۱: فعالیت لوسیفراز پلازمید PSI CHECK در زمان های مختلف بعد از ترانسفکشن

آپاپتوز و جمع‌آوری داده از نمونه‌ی کنترلی استفاده شد که با پلازمید psi check ترانسفکت شده بود.

همانطور که از نمودار ۱ پیداست ۱۸ ساعت بعد از ترانسفکشن بیان پروتئین به مقدار بالایی رسیده و این بیان در حدود ۲۴ ساعت بعد از بیان به حداکثر میزان خود رسیده است. برای ادامه کار زمان برای القای آپاپتوز ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن در نظر گرفته شد.

بررسی تشکیل فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در ۲۴ ساعت بعد از ترانسفکشن

۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن پلازمیدهای واجد جهش مورد نظر، القای آپوپتوز با استفاده از doxorubicin انجام شده و در ساعات مختلف پس از القا فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ مورد سنجش قرار گرفت.

در بررسی فعالیت کاسپاز در سلول های کنترل و ترانسفکت شده مشخص شد در هر دو سلول فعالیت کاسپاز ها به خوبی ۷ تا ۹ ساعت بعد از القا مشاهده می شود. از ساعت ۹ به بعد فعالیت

جدول ۱: فعالیت کاسپاز ۷ و ۳ در سلول‌هایی القای آپاپتوز شده‌اند. زمان تعداد ساعت بعد از القای آپاپتوز است

فعالیت کاسپاز ۳و۷ در سلول های تراانسفکت شده ($Rlu \times 10^{-3}$)	فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ در سلول های کنترل ($Rlu \times 10^{-3}$)	تعداد ساعت پس از القای آپاپتوز
۵۰	۵۵	۵
۱۱۰	۵۷	۷
۲۵۰	۶۰	۹
۴۲۰	۸۰	۱۱
۸۸۰	۲۵۰	۱۳

کاسپازها در سلول‌های ترانسفکت شده با پلازمید جهش یافته ۲۰۰ تا ۳۰۰ درصد بیشتر از سلول‌های کنترلی است که تنها القای آپاپتوز شده‌اند. در ضمن در سلول های ترانسفکت شده با پلازمید جهش یافته، فعالیت کاسپازها از لحاظ زمانی زودتر شروع می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

موجودات پر سلولی اغلب نیازمند حذف سلول‌های اضافه یا سلول های دارای پتانسیل خطرناک می باشند [۲]. برای این منظور آن‌ها معمولاً از یک مکانیسم مولکولی فعال و فوق العاده تنظیم شده به نام آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده برای کنترل تعداد سلول‌ها و اندازه بافت استفاده می‌نمایند و بدین وسیله خودشان را از خطرات سلول‌های نابه‌جا و غیرمعمول که تهدید کننده‌ی هموستازی موجود زنده هستند محافظت می‌نمایند [۱۳، ۱۲، ۶]. به عبارت دیگر آپوپتوز از مکانیسم های طبیعی سلول است که برای هموستازی و بقای موجود زنده ضروری می باشد. این پدیده توسط محرک های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی معمولاً از دو مسیر مختلف داخلی و خارجی القا می شود. مسیر خارجی معمولاً با دخالت گیرنده های خانواده مرگ مانند گیرنده‌های خانواده CD95 و گیرنده‌های TNF می باشد که پس از اتصال لیگاند به این گیرنده ها یک کمپلکس پروتئینی پیچیده به نام DISC با دخالت پروتئین های FAD و پروکاسپاز ۸ تشکیل شده که در نهایت موجب فعال شدن کاسپاز ۸ می‌گردد [۱۶-۱۴]. مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی معمولاً با وارد شدن یک پیام آسیب رسان جدی مانند تخریب DNA همراه می‌باشد که با تاثیر بر روی اعضاء پروآپوپتوزی پروتئین‌های خانواده BCL-2 و فعال کردن برخی از آن ها مانند BAK و BAX (2,12,28,31,44) باعث تشکیل کانال هایی در غشاء خارجی میتوکندری شده که به نوبه خود خروج سیتوکروم c از میتوکندری را به همراه دارد. خارج شدن سیتوکروم c از میتوکندری باعث تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم می شود که این کمپلکس موجب فعال شدن کاسپاز ۹ می گردد. کاسپاز ۹ فعال با شکست پروتئولیتیک موجب فعال شدن کاسپازهای اجرایی ۳ و ۷ می‌شود [۱۷]. این پروتئازها با تاثیر بر سوبستراهای خود، باعث به وجود آمدن تغییرات سلولی مانند قطعه قطعه شدن DNA در فواصل نوکلئوزومی، معکوس شدن غشاء سلولی، جوانه زدن غشاء سلولی و تشکیل اجسام آپوپتوزی می‌شوند [۱۸ و ۱۳]. همان طور که اشاره شد در مسیر داخلی آپوپتوز، فعال شدن کاسپاز-۹ در قالب کمپلکسی به نام آپوپتوزوم صورت می گیرد؛ این کمپلکس از کنارهم قرار گرفتن ۷ مولکول Apaf-1 تشکیل شده که در غیاب پیام آپوپتوزی، مولکول های Apaf-1 به صورت خودمهاری یا فرم بسته در سیتوپلاسم سلول حضور دارند.

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۳ – دوره۳ – شماره ۱– صفحات ۵۱–۶۰

با دریافت پیام مرگ و رهاشدن سیتوکروم C از غشای درونی میتوکندری به درون سیتوپلاسم محرک لازم برای خروج مولکول Apaf-1 از حالت خودمهاری و تغییر به فرم فعال فراهم می‌گردد. اتصال سیتوکروم C به مولکول Apaf-1 باعث شروع آبشاری از تغییرات ساختمانی در مولکول می‌شود. مولکول Apaf-1 دارای دومین‌های CARD، NOD و WRD از انتهای آمین به انتهای کربوکسیل است. دومین CARD در انتهای آمین پروتئین قرار گرفته و پس از رها شدن مولکول Apaf-1 از حالت خودمهاری با دومین CARD کاسپاز–۹ میان کنش مینماید. دومین NOD بخش میانی پروتئین بوده که در الیگومر شدن Apaf-1ها و تشکیل آپوپتوزوم نقش دارد. دومین WRD هم در انتهای کربوکسیل قرار گرفته و جایگاه اتصال سیتوکروم C است. تا مدت‌ها تصور می‌شد که عملکرد تنظیمی بخش WRD پوشاندن دومین CARD مولکول Apaf-1 در حالت خودمهاری است زیرا در مولکول Apaf-1 بسته (حالت خودمهاری) دومین CARD در دسترس نمی‌باشد در حالیکه با رها شدن سیتوکروم C و الیگومر شدن مولکول های Apaf-1 جهت تشکیل آپوپتوزوم، دومین CARD در دسترس قرار گرفته و به دومین CARD پروکاسپاز–۹ متصل می‌گردد. در سال ۲۰۱۱ ساختار کریستالی کامل مولکول Apaf-1 موشی برای اولین بار با وضوح ۳ آنگستروم تعیین شد. در این مطالعه مشخص شد دومین WRD در حداکثر فاصله از دومین CARD مولکول Apaf-1 مهار شده قرار دارد. این یافته غیرمنتظره بود چرا که تا به حال تصور می‌شد WRD با پوشاندن CARD در مولکول Apaf-1 این مولکول را در حالت خودمهاری نگه می‌دارد. در این مطالعه مشخص شد WRD به مانند یک گیره دومین NOD را نگه می‌دارد و از تغییر بنای فضایی NOD که برای تشکیل آپوپتوزوم ضروری است، ممانعت می‌کند. تاکنون در مورد نقش دومین WD بررسی‌های اندکی صورت گرفته است

بررسی نتایج مشاهده شده در القای مرگ سلولی پس از ترانسفکشن از نکات این بررسی بود که برای اولین بار فعالیت پروتئین APAF 1- جهش یافته ایی را که دومین WD2 ندارد به خوبی نشان داد. با توجه به جدول ۱ سلول های ترانسفکت شده و القا شده برای آپاپتوز به خوبی فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ را نشان می‌دهند و این فعالیت به دلیل وجود پروتئین APAF-1 بیشتر نسبت به حالت کنترل است. پس پروتئین APAF-1 جهش یافته ایی که فاقد دومین WD2 است می تواند کاسپاز ۹ خود را آزاد کرده و فعالیت طبیعی از خود نشان دهد. اما زمانی که آپاپتوزوم در سلول‌های ترانسفکت شده و القا شده توسط Doxorubicin شکل می گیرد علاوه بر حضور پروتئین‌های فاقد WD2، APAF-1های عادی هم به دلیل فعال شدن در اثر القای آپاپتوز در آپاپتوزوم حضور پیدا می‌کنند.

با توجه به جدول ۱ مشاهده می شود که سلول کنترل و هم سلول هایی که همراه ترانسفکشن القای آپاپتوز شده‌اند به خوبی فعالیت کاسپاز ۳ و ۷ را نشان می‌دهند، و این فعالیت نسبت به سلول‌های کنترل که فقط القای آپاپتوز شده‌اند ۲۰۰ تا ۳۰۰ درصد بیشتر است. دلیل این افزایش فعالیت آن است که پروتئین‌های فاقد دومین WD2 به خوبی در کنار APAF-1 طبیعی سلول می‌تواند کاسپاز ۹ را فعال و مهمتر از آن آزاد کرده و کاسپاز ۳ و ۷ را فعال کند. نکته مهم دیگری که در پایان باید به آن اشاره کرد این است که تکرار پذیری داده‌ها در حد بالایی قرار دارد.

پروتئین APAF-1 که فاقد دومین WD2 است در اثر القای آپاپتوز تشکیل آپاپتوزوم می‌دهد و سپس پروکاسپاز ۹ را به کاسپاز ۹ تبدیل می‌کند وسپس اجازه‌ی فعال کردن کاسپاز ۳ و ۷ را می‌یابد. شواهد این بررسی‌ها نشان داد که سلول‌هایی HEK293T که با سازه‌ای جهش یافته ترانسفکت شده‌اند حساسیت بیشتری نسبت به داروهای ضد سرطانی دارند و نه تنها در غلظت‌های پایین تری به داروهای ضد سرطانی پاسخ می‌دهند بلکه پاسخ آن‌ها شدیدتر و همراه با فعالیت بیشتر کاسپاز ۳ و ۷ است.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از ریاست و کارکنان مرکز تحقیقات کاربردی معاونت بهداشت، امداد و درمان ناجا که به طور مستقیم کمک‌های مادی و معنوی جهت انجام این پروژه را فراهم کردند کمال تشکر و قدردانی می نماییم.

منابع

1. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35: 495-516.
2. Nancy A, Luzebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1321-16.
3. Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. Nature 2001; 409: 207-11.
4. Bala S, Oliver H, Renault B, Montgomery K, Dutta S, Rao P, et al. Genetic analysis of the APAF1 gene in male germ cell tumors. Genes Chromosomes Cancer 2000; 28: 258-68.
5. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9

Journal of Police Medicine

Spring 2014; Vol. 3, No. 1: 51-60

complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997; 91: 479-89.

6. Watanabe T, Hirota Y, Arakawa Y, Fujisawa H, Tachibana O, Hasegawa M, et al. Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma. Brain Pathol 2003; 13: 431-9.
7. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001; 409: 928-33.
8. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. Genes Dev 1998; 12: 1551-70.
9. Dorstyn L, Read S, Cakouros D, Huh JR, Hay BA, Kumar S. The role of cytochrome c in caspase activation in Drosophila melanogaster cells. J Cell Biol 2002; 156: 1089-98.
10. Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S. Crystal structure of full-length Apaf-1: how the death signal is relayed in the mitochondrial pathway of apoptosis. Structure 2011; 19: 1074-83.
11. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. Mol Cell 1998; 1: 949-57.
12. Torkzadeh-Mahani M, Ataei F, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis. Biosens Bioelectron 2012; 38: 362-8.
13. Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. Protein Cell 2011; 2: 202-14.
14. Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, Elia AJ, Hakem A, Hakem R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. Cell 1998; 94: 739-50.
15. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1β-converting enzyme. Cell 1993; 75: 641-52.
16. Yuan S, Yu X, Topf M, Ludtke SJ, Wang X, Akey CW. Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex. Structure 2010; 18: 571-83.
17. Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell 1997; 90: 405-13.
18. Pennell RI, Lamb C. Programmed cell death in plants. Plant Cell 1997, 9: 1157-68.

مجله طب انتظامی
بهار ۱۳۹۳ – دوره۳ – شماره ۱– صفحات ۵۱–۶۰