

بررسی اثرات سیتوتوکسیک پروتئین هیبرید نوترکیب StxA1-GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی دارای گیرنده GM-CSF

مهریار حبیبی رودکنار^۱، دکتر مانا علومی^۲، دکتر محمدعلی شکرگذار^۳، دکتر نادر شاه‌رخی^۴،
آمنه محمدی روشنده^۵، دکتر یوشیکازو کوواهارا^۶، دکتر مانابو فوکوموتو^۷

چکیده

سابقه و هدف

برنامه‌های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها، تحویل هدف دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی می‌باشد. در ایمونوتوکسین‌ها از قسمت سیتوتوکسیک توکسین (دومین کاتالیتیک) باکتری یا گیاه و حذف قسمت اتصال دهنده و جایگزینی آن با یک لیگاند اختصاصی برای یک گیرنده سلولی استفاده می‌شود. در مطالعه قبلی یک ایمونوتوکسین جدید، شینگاتوکسین - GM-CSF، طراحی و در سیستم باکتریایی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد. در تحقیق حاضر فعالیت سیتوتوکسیک شینگاتوکسین - GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF) را بیان می‌کنند مورد مطالعه قرار گرفت. به علاوه اثر آنتی‌بادی ضد گیرنده GM-CSF در مهار فعالیت سیتوتوکسیک شینگاتوکسین - GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی دارای گیرنده مذکور ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی خونی و جامد که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF) را بیان می‌کردند، در محیط کشت RPMI کشت داده شدند. سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش‌های رنگ سنجی تریپان‌بلو و MTT ارزیابی شد. اثر دراز مدت سیتوتوکسیسیته با استفاده از سنجش کلونوزنیک برای رده‌های سلول‌های سرطانی جامد انجام شد. گیرنده GM-CSF با استفاده از آنتی‌بادی آنتی GM-CSF مهار شد.

یافته‌ها

در بین رده‌های سلولی تومورهای خون ساز، K562 و در بین رده‌های سلولی تومورهای جامد، LS174T بیشترین سیتوتوکسیسیته را در غلظت ۴۰ ng/ml و در ۲۴ ساعت نشان دادند. MCF-7، PC-3 و DU145 بیشترین توکسیسیته را در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت ۱۶۰ ng/ml نشان دادند. خنثی‌سازی StxA1-GM-CSF (Neutralization) با آنتی‌بادی GM-CSF منجر به از بین رفتن اثر توکسیسیته شد.

نتیجه‌گیری

پروتئین نوترکیب هیبرید جدید، شینگاتوکسین - GM-CSF، فعالیت بیولوژیک خود را حفظ نموده و بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF) را بیان می‌کردند به طور اختصاصی اثر سیتوتوکسیسیته را اعمال می‌کند و می‌تواند به عنوان یک رویکرد جدید برای درمان سرطان در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: شینگاتوکسین، محرک کلونی گرانولوسیت، ماکروفاژ، سیتوتوکسیسیته، سلول‌های سرطانی

تاریخ دریافت: ۸۴/۶/۷

تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۷

۱- مؤلف مسئول: دانشجوی PhD فرآورده‌های بیولوژیک انستیتو پاستور ایران- خیابان پاستور - پلاک ۶۹ - کدپستی: ۱۳۱۶۴

۲- PhD فرآورده‌های بیولوژیک - استادیار گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران

۳- PhD فرآورده‌های بیولوژیک - استادیار بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران

۴- دانشجوی PhD آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- PhD پاتولوژی - استادیار دانشگاه توهوکو ژاپن

۶- PhD پاتولوژی - استاد دانشگاه توهوکو ژاپن

مقدمه

هدف نهایی درمان سرطان، حذف سلول‌های توموری با کمترین آسیب به سلول‌های طبیعی است. رویکردهای موجود در این مورد شامل جراحی توده توموری، از بین بردن تومور توسط اشعه و درمان سیستماتیک به وسیله شیمی درمانی می‌باشند. تقریباً نیمی از سرطان‌ها با روش‌های فوق درمان نمی‌شوند و علاوه بر این مقاومت دارویی از مهم‌ترین مشکلات در درمان سرطان می‌باشد. بنابراین استراتژی‌های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها تحویل هدف دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی است (۱، ۲). سلول‌های سرطانی گیرنده‌های سطحی یا مولکول‌های ویژه دیگری را بروز می‌دارند که آن‌ها را از سلول‌های اطراف خود متمایز می‌سازد. یکی از این روش‌های جدید، از بین بردن اختصاصی سلول‌های سرطانی با استفاده از سم‌های گیاهی و باکتریایی است (۱).

ایمونوتوکسین‌ها شامل توکسین‌ها و آنتی‌بادی‌ها می‌باشند که البته این مفهوم اولیه آن‌ها بوده است. اما امروزه ایمونوتوکسین شامل مفهوم بسیار وسیعی است و لیگاند‌های دیگر از جمله سیتوکین، فاکتور رشد و هورمون را که به توکسین متصل می‌شوند دربر می‌گیرند (۳). در ایمونوتوکسین‌ها از قسمت سیتوتوکسیک توکسین (دومین کاتالیتیک) باکتری یا گیاه، حذف قسمت اتصال دهنده و جایگزینی آن با یک لیگاند اختصاصی برای یک گیرنده سلولی استفاده می‌شود. شینگاتوکسین و توکسین‌های مشابه آن متعلق به خانواده بزرگی از گروه پروتئین‌های AB (دارای یک دومین کاتالیتیک A و دومین اتصال به نام B هستند) از سموم گیاهی و باکتریایی هستند که سلول‌های هدف را از طریق اتصال به سطح سلول توسط گیرنده‌های خاصی اندوسیتوز کرده، سپس وارد سیتوزول شده و در نهایت با مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی آن را از بین می‌برند (۳).

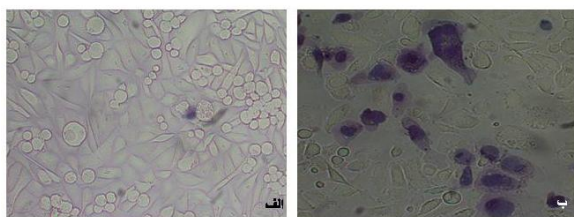
فاکتور محرک کلونسی گرانولوسیت- ماکروفاژ (GM-CSF) یک تنظیم کننده مهم تکثیر و تمایز پیش‌سازهای میلوئید است و سبب افزایش عملکرد گرانولوسیت‌های بالغ و فاگوسیت‌های منونوکلتر می‌شود.

گیرنده GM-CSF از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا به GM-CSF با میل ترکیبی پایین (1 nmol/l تا 17 nmol/l) متصل می‌شود. زیر واحد بتا به تنهایی به GM-CSF متصل نمی‌شود، بلکه توأم با زیر واحد آلفا تشکیل گیرنده، با میل ترکیبی بالا را می‌دهد (2 pmol/l تا 100 pmol/l) (۴، ۵).

GM-CSF نه تنها برای تضعیف اثرات میلوپرسیو شیمی درمانی در سرطان‌های هماتوپیتیک بلکه در تومورهای جامد هم استفاده می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده است که GM-CSF معمولاً باعث تحریک سلول‌های سرطانی جامد نمی‌شود. همانند انواع لوکمیا، تومورهای جامد مثل کارسینومای معده ای - روده ای، کلیه، ریه، سینه و پروستات، گیرنده GM-CSF یا حداقل زیر واحد آلفای آن را بیان می‌کنند (۴). مطالعات اخیر نشان داده است که گیرنده GM-CSF در اکثر پیش نیازهای سلول‌های هماتوپیتیک وجود ندارد بلکه در طی بلوغ، بیان آن‌ها افزایش می‌یابد (۶). یافته‌های فوق می‌تواند بیانگر این نکته باشد که گیرنده GM-CSF یک هدف مناسب برای ایمونوتوکسین است. در مطالعه قبلی ما یک ایمونوتوکسین جدید، شینگاتوکسین - GM-CSF، طراحی و در سیستم باکتریایی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد (۷). در تحقیق حاضر فعالیت بیولوژیکی آن بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

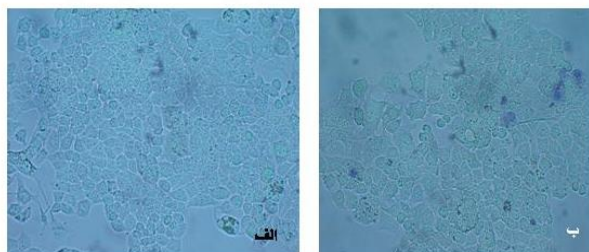
مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پروتئین هیبرید نو ترکیب StxA1-GM-CSF در *E.coli* تولید شد (۷). به طور خلاصه دومین کاتالیتیک شینگاتوکسین و GM-CSF از طریق PCR هم پوشانی به یکدیگر متصل و دروکتور PBAD کلون و به 10 TOPT ترانسفورم شدند و با استفاده از آرایینوز بیان صورت گرفت و سپس با استفاده از برچسب هیستیدین تخلیص شد. رده‌های U937، HL60، LCL (مشتق از خون) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI) و رده‌های سلولی LS174T (کلون)، K562 (خون)، PC3، DU145 (پروستات)، HepG2 (کبد) از انستیتو سرطان دانشگاه توهوگو ژاپن تهیه شدند.



شکل ۳: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی PC3

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

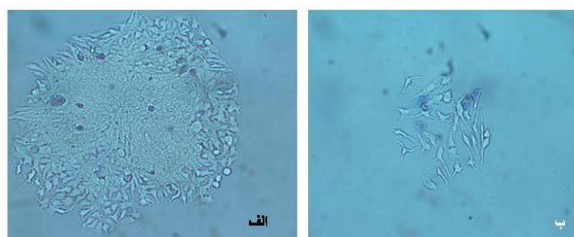
(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتین هیبرید نو ترکیب بعد از ۷۲ ساعت



شکل ۴: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HepG2

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتین هیبرید نو ترکیب بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۵: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی MCF-7 حاصل از

سنجش کلونی بعد از یک هفته

(الف) MCF-7 تیمار شده با PBS (کنترل)

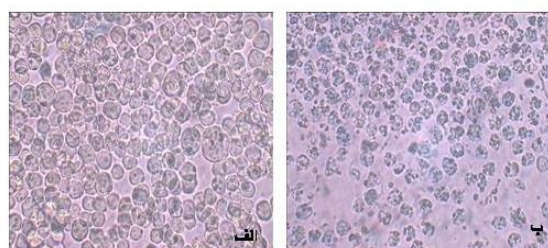
(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتین هیبرید نو ترکیب بعد از یک هفته. در گروه کنترل اندازه کلونی بزرگ، متراکم و سلول‌ها زنده، در حالی که در گروه آزمون تعداد کلونی‌ها کوچک، تراکم پایین و سلول‌های مرده نیز مشاهده می‌شود.

کلیه رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI (سیگما، Roswell Park Memorial Institute Medium) غنی شده با ۱۰ تا ۲۰ درصد FBS (Gibco-BRL) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حاوی ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند (۸).

ارزیابی سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش‌های رنگ سنجی

الف - تریپان بلو

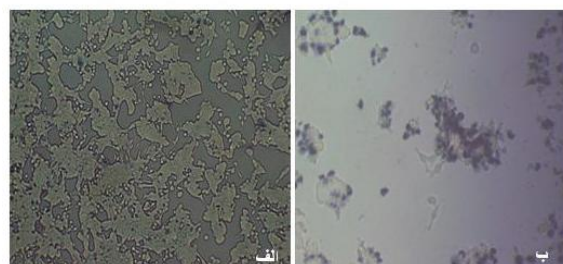
$10^5 \times 3 - 2$ سلول در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف Al-GM-CSF (۱۶۰-۵ ng/ml) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و یک هفته، تریپان بلو (سیگما) به میزان ۲ ng/ml به سلول‌ها اضافه شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز کتراسست مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های مرده به صورت آبی و سلول‌های زنده به صورت بی رنگ قابل انتظار بودند (شکل‌های ۱ تا ۵) (۹).



شکل ۶: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HL60

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتین هیبرید نو ترکیب بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۷: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی LS174T

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۴۰ ng/ml پروتین هیبرید بعد از ۲۴ ساعت

ب- MTT

(Dimethyl Thiazol diphenyl tetrazolium bromide)

به منظور تأیید نتایج حاصل از تریپان بلو، میزان زنده ماندن یا سیتوتوکسیسیته با استفاده از آزمون MTT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۲۰ تا ۳۰ هزار سلول از رده‌های مختلف در محیط RPMI کشت داده شدند، ۲۴ ساعت بعد غلظت‌های مختلف از پروتئین‌های متفاوت AL - GM-CSF, GM-CSF / AL - GM-CSF, AL, GM-CSF, و Layset باکتریایی وکتور خالی محلول در PBS، در غلظت‌های متفاوت و زمان‌های مختلف به آن‌ها اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از MTT (۵۰ ng/ml)، سیگما) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این حالت سلول‌های زنده قادر به تبدیل MTT به فورمازان می‌شوند، در حالی که سلول‌های مرده قادر نیستند این تغییر متابولیک را ایجاد کنند (۱۰).

میزان جذب نوری در ۵۷۰ OD با استفاده از قرائت‌کننده میکروپلیت (Lab system) انجام شد. میزان سیتوتوکسیسیته هر کدام از گروه آزمون نسبت به کنترل مقایسه شد.

سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش سنجش کلونی

۱۰۰۰ سلول از رده‌های مختلف در دیش ۵ سانتی متری در دو گروه کنترل و آزمون، ۱۶۰ ng/ml (Al-GM-CSF) به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. بعد از آن تعداد کلونی‌ها (بیشتر از ۱۰ سلول) شمارش شدند (۱۱).

مهار گیرنده

۱ ng/ml آنتی بادی منوکلونال Anti-Goat GM-CSF (R and D) و ۱۰۰ ng/ml پروتئین هیبرید نو ترکیب در طول شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و

سپس به رده سلولی HL60 اضافه شد. ۴۸ ساعت بعد سیتوتوکسیسیته از طریق سنجش MTT انجام شد.

یافته‌ها

جدول ۱، LC50 با غلظتی از توکسین که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌میرند را نشان می‌دهد. در بین رده‌های سلولی تومورهای هماتوپوئیتیک، K562 و در بین رده‌های سلولی تومورهای جامد، LS174T بیشترین سیتوتوکسیسیته را در غلظت ۴۰ ng/ml و در ۲۴ ساعت نشان دادند. MCF-7، PC-3 و DU145 سه رده سلولی بودند که فقط گیرنده با میل ترکیبی را ابراز کردند. این سلول‌ها بیشترین توکسیسیته را در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت ۱۶۰ ng/ml نشان دادند.

جدول ۱: LC50 رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی خونی و جامد حاوی گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاژ (GM-CSF)

LC50(ng/ml) ± SD	نوع سلول	رده سلولی
۷/۶۳ ± ۹۱/۶۶	پرومیلوسایتیک	HL60
۵ ± ۷۵	لنفوسیت‌های محیطی	LCL
۱۰/۴۰ ± ۱۳۱/۶۶	منوسیت	U937
۲/۸۴ ± ۱۸	هماتوپوئیتیک	K562
۳/۸۱ ± ۲۰	کولون	LSL74T
>۱۶۰ ng/ml	پروستات	DU145
>۱۶۰ ng/ml	پروستات	PC3
۱۵۰ ng/ml ± ۴/۶۶	سینه	MCF-7

رده سلولی HepG2 به پروتئین هیبرید حساسیت نشان نداد. این رده سلولی، گیرنده GM-CSF را بیان نمی‌کند. به منظور تعیین این‌که آیا سیتوتوکسیسیته StxAI-GM-CSF مستلزم وارد شدن پروتئین هیبرید به داخل سلول از طریق گیرنده GM-CSF است، آزمون خنثی سازی انجام شد. خنثی سازی (Neutralization) StxAI-GM-CSF با آنتی بادی GM-CSF منجر به از بین رفتن اثر توکسیسیته شد (شکل ۶).

GM-LS174 T، HL60 گیرنده با میل ترکیبی بالای GM-CSF و PC-3 و DU145، MCF-7 و CSF گیرنده با میل ترکیبی پایین را بیان می کردند (۴،۱۲).

LS174 T و K562 دو رده سلولی بودند که بیشترین حساسیت را نسبت به StxA1-GM-CSF نشان دادند.

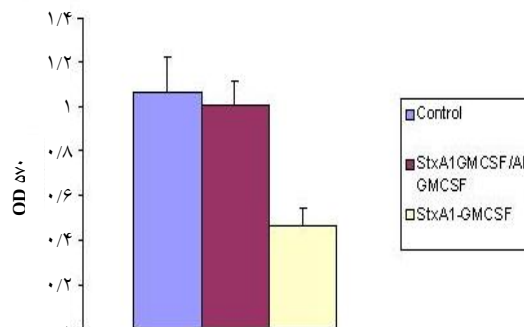
در مطالعات قبلی پروتئین هیبرید دیفتری (DT-GM-CSF) در غلظت 18 ± 70 ng/ml و در مدت ۴۸ ساعت، ۵۰٪ (LC50) خاصیت سیتوتوکسیسیته پروتئین را بروز داد اما پروتئین هیبرید در مطالعه اخیر در غلظت 20 ng/ml و در مدت ۲۴ ساعت ۵۰ درصد سیتوتوکسیسیته را دارا بود (۴).

DT-GM-CSF اثر قابل ملاحظه ای بر K562 نشان نداد اما توکسین هیبرید StxA1-GM-CSF در غلظت 40 ng/ml و در ۲۴ ساعت دارای سیتوتوکسیسیته نزدیک به ۱۰۰ درصد بود. سیتوتوکسیسیته StxA1-GM-CSF در مقایسه با DT-GM-CSF بر رده های سلولی HL60 و DU937 کمتر بود (۴). هر چند در مطالعه ای دیگر که DT-GM-CSF در سیستم باکولو ویروس بیان شده بود، بر روی HL60 غلظت 30 ng/ml تقریباً ۱۰۰ درصد اثر سیتوتوکسیسیته وجود داشت اما در این مطالعه در غلظت 160 ng/ml از پروتئین هیبرید تقریباً مشابه مطالعه قبلی بود (۱۳). در مطالعه قبلی از سیستم باکولو ویروس برای بیان استفاده گردید، حال این که در مطالعه اخیر از سیستم پروکاریوت استفاده شد، تفاوت در میزان سیتوتوکسیسیته، علاوه بر تفاوت توکسیسیته توکسین دیفتری و شیگا، می تواند به خاطر استفاده از دو سیستم متفاوت باشد.

سیتوتوکسیسیته HL60 در مقایسه با U937 علیرغم این که گیرنده GM-CSF کمتری بیان می دارد، بیشتر بود. همچنین حساسیت متغیری برای DT-GM-CSF (توکسین دیفتری) گزارش شده است که در آن LC50 برای U937 ۱۵۴ برابر در مقایسه با HL60 کمتر بود (۴).

مطالعات خشی سازی نیز نشان داد که برای سیتوتوکسیسیته نیاز به اتصال GM-CSF به گیرنده آن در سطح سلول ها است. در مطالعه مشابه که در آن دومین کاتالیک شیگاتوکسین به CD4 متصل شد، مهار CD4 (Blocking) از اتصال آن به gp120 ممانعت به عمل آورده و در نهایت از سیتوتوکسیسیته جلوگیری کرد (۱۴).

شکل ۶: نتایج حاصل از مهار گیرنده GM-CSF با استفاده از سنجش MTT



درصد سیتوتوکسیسیته در غلظت 40 ng/ml برای LS174 T و 160 ng/ml برای MCF-7 بعد از یک هفته در سنجش کلونوزنیک، اندکی بیشتر از میزان سیتوتوکسیسیته در سنجش MTT بود. ($58 \pm 3/5$ به 63 ± 4 برای MCF-7 و $83 \pm 4/3$ به $88 \pm 4/6$ برای LS174 T).

DU145 و PC-3 کلون های واضح و مجزایی تشکیل ندادند لذا در سنجش کلونی لحاظ نشدند.

علاوه بر کاهش تعداد کلونی در گروه آزمون نسبت به کنترل، رنگ آمیزی تریپان بلو کلون های MCF-7 بعد از یک هفته نتایج دیگری را آشکار کرد. برخی از سلول ها به رنگ آبی درآمدند که بیانگر مرگ سلولی بود. اندازه و تراکم کلون ها نیز کاهش یافته بود.

نتایج مذکور بیانگر این است که MCF-7 به عنوان یک رده سلولی که گیرنده با میل ترکیبی پایین را ابراز می کند سیتوتوکسیسیته StxA1-GM-CSF در دراز مدت در آن به وجود می آید.

بحث

در این تحقیق اثر سیتوتوکسیسیته پروتئین هیبرید نو ترکیب بر ۸ رده سلول سرطانی که گیرنده GM-CSF را بیان می کردند، مورد مطالعه قرار گرفت. این سلول ها عبارت بودند از K562، LCL، U937، HL60، (رده سلول های مشتق از سیستم هماتوپوئیتیک) و LS174 T (کلون)، MCF-7 (سینه)، DU145 و PC3 (پروستات) و رده سلولی HepG2 (کبد) به عنوان کنترل منفی برای گیرنده GM-CSF استفاده شدند. U937، LCL، K562،

حضور هم زمان GM-CSF و DT-GM-CSF منجر به کاهش یا بلوکه کردن اثر سیتوتوکسیسیته بر رده‌های سلولی که گیرنده GM-CSF را بیان می‌کنند، می‌شود. بنابراین GM-CSF تولید شده توسط این سلول‌ها می‌تواند در غلظت بهینه برای سیتوتوکسیسیته تأثیر گذار باشد. رده سلولی MCF-7، GM-CSF تولید نمی‌کند (۱۸). بنابراین نسبت به DU145 و PC3 حساس‌تر می‌باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا کاربرد این پروتئین هیبرید نو ترکیب در مرحله کارآزمایی بالینی را نشان دهد اما با وجود این، نتایج به‌دست آمده نوید دهنده کاربرد آن در آینده است.

نتیجه گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که هیبرید شیگاتوکسین-GM-CSF فعالیت بیولوژیک مناسبی داشته و با اتصال به گیرنده GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی، فعالیت سیتوتوکسیک شیگاتوکسین به طور اختصاصی اعمال می‌شود. در همین ارتباط سلول‌های سرطانی دارای گیرنده با میل ترکیبی پایین، توکسیسیته شدیدی را بروز می‌دهند. همچنین استفاده از آنتی بادی ضد GM-CSF از اتصال اختصاصی هیبرید به رسپتور اختصاصی ممانعت کرده و از اثر کشندگی هیبرید شیگاتوکسین-GM-CSF بر سلول‌های سرطانی دارای گیرنده اختصاصی GM-CSF جلوگیری به عمل می‌آورد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از دکتر امیر امان‌زاده محقق محترم بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران که در تهیه برخی از تصاویر سلولی در این مطالعه ما را یاری کرده‌اند قدردانی می‌نمایم.

رده‌های سلولی LS174 T، K562، U937، HL60 و LCL گیرنده با میل ترکیبی بالا و رده‌های سلولی PC3، DU145 و MCF-7 گیرنده با میل ترکیبی پایین (زیر واحد آلفا) را بیان می‌کردند. به طور کلی سیتوتوکسیسیته در این رده‌های سلولی در مقایسه با رده‌های سلولی که گیرنده با میل ترکیبی بالا را بیان می‌کردند کمتر بود.

این اولین مورد مطالعه اثر یک ایمونوتوکسین بر روی سلول‌هایی است که گیرنده با میل ترکیبی پایین را بیان می‌کنند. همان‌طوری که قبلاً ذکر شده است، گیرنده GM-CSF از دو زیر واحد α و β تشکیل شده است. اتصال گیرنده با میل ترکیبی بالا به لیگاند خود، GM-CSF، باعث داخل شدن سریع کمپلکس Al-GM-CSF به داخل سلول می‌شود (۱۵).

اتصال گیرنده با میل ترکیبی بالا ($K_d = 10$ تا 50 pmol/l) در مقایسه با گیرنده با میل ترکیبی پایین (2 nmol تا 0.7 nmol) از قدرت اتصال بالاتری برخوردار است (۴، ۶). بنابراین رده‌های سلولی PC3، MCF-7 و DU145 در غلظت بیشتر و در زمان بیشتری نسبت به رده‌های سلولی که گیرنده با میل ترکیبی بالا را بیان می‌دارند اثر سیتوتوکسیسیته دارند.

اتصال GM-CSF در پروتئین هیبرید به گیرنده با میل ترکیبی پایین باعث داخل شدن (Internalization) سریع نمی‌شود و احتمالاً در طی recycling گیرنده، کمپلکس گیرنده - لیگاند وارد سلول شده و در آن‌جا اثر سیتوتوکسیسیته خود را اعمال می‌کند. این پدیده در مورد سایر گیرنده‌ها نیز گزارش شده است (۱۶). علت دیگر سیتوتوکسیسیته پایین رده‌های سلولی DU145 و PC3، ترشح GM-CSF توسط این سلول‌ها است (۱۷). به نظر می‌رسد این رده‌های سلولی برای تکثیر یا تولید کلونی به GM-CSF نیاز دارند. مطالعات نشان داده است که

References :

- 1- Reiter Y. Recombinant immunotoxins in targeted cancer cell therapy. *Adv Cancer Res* 2001; 81: 93-124.
- 2- Fracasso G, Bellisola G, Castelletti D, Tridente G, Colombatti M. Immunotoxins and their conjugates: preparation and general characteristics. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4(5):545-62.
- 3- Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 2004; 44: 371-383.
- 4- Kreitman RJ, Pastan I. Recombinant toxins containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells. *Blood* 1997; 90(1): 252-259.
- 5- Chiba S, Shibuya K, Piao Y, Tojo A, Sasaki N, Matsuki S, *et al.* Identification and cellular distribution of distinct proteins forming human GM-CSF receptor. *Cell Reg* 1990; 1(4): 327-335.
- 6- Wognum AW, Westerman W, Visser TP, Wagemaker G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34⁺ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood* 1994; 84: 764-774.
- 7- Habibi Roudkenar M, Bouzari S, Oloomi M, Jafari A, Shahrokhi A, Shokrgozar MA. Expression of a chimeric protein containing the catalytic domain of Shiga-like toxin and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) in *Escherichia coli* and its recognition by reciprocal antibodies. *Iran Biomed J* 2005; 32(4): 143-148.
- 8- Mahdian R, Shokrgozar MA, Amanzadeh A. Human monocyte-derived dendritic cells efficiently take up autologous and allogenic tumor cell lysate as confirmed by flowcytometry. *Iran J Med Sci* 2003; 28: 75-80.
- 9- Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S, Fleischer S, Packer L. Trypan blue dye exclusion method. *Meth enz* 1978; 52: 60-71.
- 10- Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986; 9: 157-165.
- 11- Frankel AE, Hall PD, Burbage C, Vesely J, Willingham M, Bhalla K, *et al.* Of the apoptotic response of human myeloid leukemia cells to a Diphtheria toxin granulocyte-macrophage colony stimulating factor fusion protein. *Blood* 1997; 90: 3654-3661.
- 12- Chen Z, Yang Y, Xiao Y, Zhao J. Expression and significance of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in human prostate cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004; 10(9): 655-7.
- 13- Williams MD, Rostovtsev A, Narla RK, Uckun FM. Production of recombinant DT_cGM-CSF in a Baculovirus expression vector system for biotherapy of GM-CSF - receptor sensitive hematologic malignancies. *Protein Express Purif* 1998; 13: 210-221.
- 14- Al-Jaufy AY, Haddad JA, King SR, McPhee RA, Jackson MP. Cytotoxicity of a Shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein to human immunodeficiency virus-infected cells. *Infect Immun* 1994; 62: 956-960.
- 15- Frankel AE, Hall PD, Burbage C, Vesely J, Willingham M, Bhalla K, *et al.* Modulation of the apoptotic response of human myeloid leukemia cells of a diphtheria toxin granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein. *Blood* 1997 (90): 3654-3661.
- 16- Mitchell H, Choudhury A, Pagano RE, Leof EB. Ligand-dependent and -independent transforming Growth Factor β Receptor recycling regulated by Claterin-mediated endocytosis and Rab11. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 4166-4177.
- 17- Savarese DM, Valinski H, Quesenberry P, Savarese T. Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 1998; 34 (2) : 80 - 91.
- 18- Morgan H, Tumber PA. Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and down regulating Granulocyte / Macrophage Colony - Stimulating actor. *Int J Cancer* 2004; 109: 635-660.

Cytotoxic evaluation of stxA1-GM-CSF recombinant hybrid on different cancer cell lines expressing GM-CSF receptor

Habibi Roudkenar M.¹ (MS), Oloomi M.² (PhD), Shokrgozar M.A.³ (PhD), Shahrokhi N.² (MS), Mohammadi Roushandeh A.⁴ (MS), Kuwahara Y.⁵ (PhD), Fukumoto M.⁵ (MD-PhD)

¹ Pasteur Institute of Iran

² Pasteur Institute of Iran, Department of Molecular Biology

³ Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank of Iran (NCBI)

⁴ Medical University of Tehran

⁵ Tohoku University- Japan

Abstract

Background and Objectives

Immunotoxins are comprised of cell targeting and cell killing moieties. Immunotoxins have been proposed as new strategy for cancer treatment. In this study, catalytic domain of Shiga-toxin (A1) was fused to human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (h GM-CSF). The fused gene was already expressed in E.coli and the expressed protein was analysed for its cytotoxic activity on human cancer cell lines expressing GM-CSF receptor (GM-CSFR). Moreover, the impact of GM-CSF receptor on inhibition of cytotoxic effect of Shiga-toxin-GM-CSF recombinant hybrid in cell lines expressing GM-CSF receptor (GM-CSFR) was evaluated.

Materials and Methods

Cell lines were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10-20% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco-BRL). Cytotoxic activity was checked on the cell lines and was measured by trypan blue staining and MTT assay. GM-CSF receptor was blocked by anti-GM-CSF antibody.

Results

Cytotoxicity studies revealed that the chimeric protein induced cytotoxic effect on different cell lines. This effect was found to be specific due to the presence of killing moiety (A1) that exerts its effect through specific cell targeting domain i.e. GM-CSF, by binding to its receptor present on those cell lines. K562 and LS174T were the most sensitive.

Conclusions

Our results revealed that the hybrid protein is toxic to the cancer cell lines bearing GM-CSF receptor; this effect could be a potential factor for further consideration of hybrid protein as a therapeutic agent.

Key words: Shiga-toxin, Granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM-CSF), Cytotoxicity, Cancer cells
SJIBTO 2006; 3(1):1-8

Received: 29 Aug 2005

Accepted: 26 Feb 2006

Correspondence: Habibi Roudkenar M. (MS), PhD student of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran No. 69, Pasteur Avenue, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66468761-9; Fax: (+9821) 66468761-9
E-mail: mhr376@yahoo.com