

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۱-۸)

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

مهریار حبیبی رودکنار<sup>۱</sup>، دکتر مانا علومی<sup>۲</sup>، دکتر محمدعلی شکرگذار<sup>۳</sup>، دکتر نادر شاهرخی<sup>۴</sup>، آمنه محمدی روشنده<sup>۵</sup>، دکتر یوشیکازو کموها<sup>۶</sup>، دکتر مانا بو فوکوموتو<sup>۷</sup>

### چکیده سابقه و هدف

برنامه‌های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها، تحويل هدف دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی می‌باشد. در ایمونوتوكسین‌ها از قسمت سیتو توکسیک 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 ایمونوتوكسین جدید، شیگاتوکسین – GM – CSF، طراحی و در سیستم باکتریانی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد. در تحقیق حاضر فعالیت سیتو توکسیک شیگاتوکسین – GM – CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که گیرنده فاکتور محرك کلونی گرانولوسیت – ماکروفاز (GM – CSF) را بیان می‌کنند مورد مطالعه قرار گرفت. به علاوه اثر آنتی‌بادی ضد گیرنده GM-CSF در مهار فعالیت سیتو توکسیک شیگاتوکسین – 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 محرك کلونی گرانولوسیت – ماکروفاز (GM-CSF) را بیان می‌کردند، در محیط کشت RPMI کشت داده شدند. سیتو توکسیسیتی با استفاده از روش‌های رنگ سنجی تریپان‌بلو و MTT ارزیابی شد. اثر دراز مدت سیتو توکسیسیتی با استفاده از سنجش کلونوژنیک 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 سیتو توکسیسیتی را در غلاظت ۴۰ ng/ml و در ۲۴ ساعت نشان دادند. MCF-7.PC-3 و DU145 بیشترین توکسیسیتی را در زمان ۷۲ ساعت و در غلاظت ۱۶۰ ng/ml نشان دادند. خشی سازی (StxAl-GM-CSF(Neutralization) با آنتی‌بادی GM-CSF منجر به از بین رفتن اثر توکسیسیتی شد.

### نتیجه گیری

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

**کلمات کلیدی:** شیگاتوکسین، محرك کلونی گرانولوسیت، ماکروفاز، سیتو توکسیسیتی، سلول‌های سرطانی

تاریخ دریافت: ۱۴/۶/۷

تاریخ پذیرش: ۱۴/۱۲/۷

۱- مؤلف مسئول: دانشجوی PhD فرآوردهای بیولوژیک استیتو پاستور ایران- خیابان پاستور - پلاک ۶۹ - کد پستی: ۱۳۱۶۴

۲- PhD فرآوردهای بیولوژیک - استادیار گروه بیولوژی مولکولی، استیتو پاستور ایران

۳- PhD فرآوردهای بیولوژیک - استادیار بانک سلولی ایران ، استیتو 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**

گیرنده GM-CSF از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا به GM-CSF با میل ترکیبی پایین ( $1 \text{ pmol/l}$ ) متصل می شود. زیر واحد بتا به تنها بی به GM-CSF متصل نمی شود، بلکه توأم با زیر واحد آلفا تشکیل گیرنده، با میل ترکیبی بالا را می دهد ( $20 \text{ pmol/l}$ ).<sup>(۴, ۵)</sup>

GM-CSF نه تنها برای تضعیف اثرات میلوساپرسیو شیمی درمانی در سرطان های هماتوپویتیک بلکه در تومورهای جامد هم استفاده می شود. همچنین مطالعات نشان داده است که GM-CSF معمولاً باعث تحریک سلول های سرطانی جامد نمی شود. 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 می کنند.<sup>(۶)</sup> مطالعات اخیر نشان داده است که گیرنده GM-CSF در اکثر پیش نیازهای سلول های هماتوپویتیک وجود ندارد بلکه در طی بلوغ، بیان آنها افزایش می یابد.<sup>(۶)</sup> یافته های فوق می تواند بیانگر این نکته باشد که گیرنده GM-CSF یک هدف مناسب برای ایمونوتوكسین است. در مطالعه قبلی مایک ایمونوتوكسین جدید، شیگاتوکسین - GM-CSF، طراحی و در سیستم باکتریایی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد.<sup>(۷)</sup> در تحقیق حاضر فعالیت بیولوژیکی آن بر رده های مختلف سلول های سرطانی مطالعه شد.

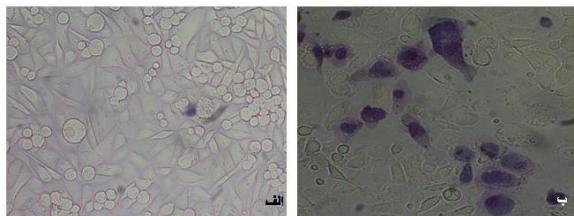
**مواد و روش ها**

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پروتئین هایپرید نوترکیب StxA1-GM-CSF در *E.coli* تولید شد.<sup>(۷)</sup> به طور خلاصه دو مین کاتالیتیک شیگاتوکسین و GM-CSF از طریق PCR هم پوشانی به یکدیگر متصل و دروکتور PBAD کلون و به TOPT<sup>10</sup> ترانسفورم شدند و با استفاده از آرایبینوز بیان صورت گرفت و سپس با استفاده از برچسب هیستیدین تخلیص شد. رده های HL60، U937، LCL (مشتق از خون) از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران (NCBI) و رده های سلولی LS174T (کولون)، K562 (خون)، PC3، DU145 (پروستات)، HepG2 (کبد) از انسیتو سرطان دانشگاه توهوکو ژاپن تهیه شدند.

هدف نهایی درمان سرطان، حذف سلول های توموری با کمترین آسیب به سلول های طبیعی است. رویکردهای موجود در این مورد شامل جراحی توده توموری، از بین بردن تومور توسط اشعه و درمان سیستماتیک به وسیله شیمی درمانی می باشند. تقریباً نیمی از سرطان ها با روش های فوق درمان نمی شوند و علاوه بر این مقاومت دارویی از مهم ترین مشکلات در درمان سرطان می باشد. بنابراین استراتژی های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها تحويل هدف دار مواد سمی به سلول های سرطانی است.<sup>(۲, ۱)</sup> سلول های سرطانی گیرنده های سطحی یا مولکول های ویژه دیگری را بروز می دارند که آنها را از سلول های اطراف خود تمایز می سازد. یکی از این روش های جدید، از بین بردن اختصاصی سلول های سرطانی با استفاده از سه های گیاهی و باکتریایی است.<sup>(۱)</sup>

ایمونوتوكسین ها شامل توکسین ها و آنتی بادی ها می باشند که البته این مفهوم اولیه آنها بوده است. اما امروزه ایمونوتوكسین شامل مفهوم بسیار وسیعی است و لیگاندهای دیگر از جمله سیتوکین، فاکتور رشد و هورمون را که به توکسین متصل می شوند دربر می گیرند.<sup>(۳)</sup> در ایمونوتوكسین ها از قسمت سیتوکسیک توکسین (دومین کاتالیتیک) باکتری یا گیاه، حذف قسمت اتصال دهنده و جایگزینی آن با یک لیگاند اختصاصی برای یک گیرنده سلولی استفاده می شود. شیگاتوکسین و توکسین های مشابه آن متعلق به خانواده بزرگی از گروه پروتئین های AB (دارای یک دومین کاتالیتیک A و دومین اتصالی به نام B هستند) از سوم گیاهی و باکتریایی هستند که سلول های هدف را از طریق اتصال به سطح سلول توسط گیرنده های خاصی اندوسیتوز کرده، سپس وارد سیتوزول شده و در نهایت با مهار ستز پروتئین و مرگ سلولی آن را از بین می برنند.<sup>(۳)</sup>

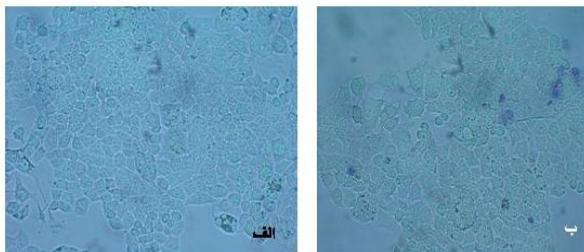
فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت - ماکروفاز (GM-CSF) یک تنظیم کننده مهم تکثیر و تمایز پیش سازهای میلوئید است و سبب افزایش عملکرد گرانولوسیت های بالغ و فاگوسیت های منوکلر می شود.



شکل ۳: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی PC3

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

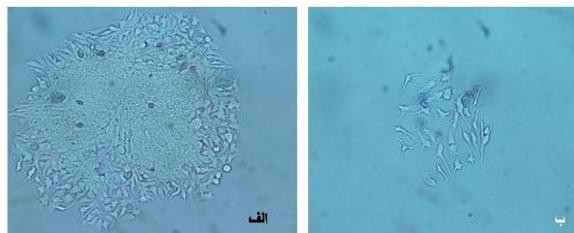
(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتئین هیالورید نوترکیب بعد از ۷۲ ساعت



شکل ۴: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HepG2

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتئین هیالورید نوترکیب 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)

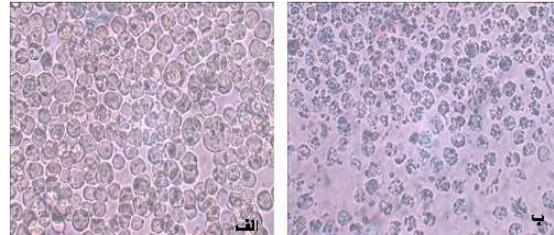
(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتئین هیالورید نوترکیب بعد از یک هفته. در گروه کنترل اندازه کلونی بزرگ، متراکم و سلول‌ها زنده، در حالی که در گروه آزمون تعداد کلونی‌ها کوچک، تراکم پایین و سلول‌های مرده نیز مشاهده می‌شود.

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

ارزیابی سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش‌های رنگ سنجی

### الف - تریپان بلو

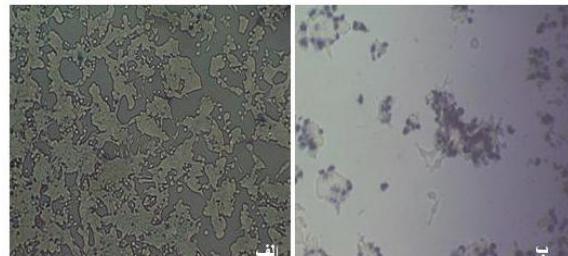
$3 \times 10^5$  سلول در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف Al-72, ۴۸, ۲۴, ۵-۱۶۰ ng/ml GM-CSF ساعت و یک هفته، تریپان بلو (سیگما) به میزان ۲ ng/ml به سلول‌ها اضافه شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز کتراست مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های مرده به صورت آبی و سلول‌های زنده به صورت بی رنگ قابل انتظار بودند (شکل‌های ۱ تا ۵) (۹).



شکل ۱: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HL60

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۱۶۰ ng/ml پروتئین هیالورید نوترکیب بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۲: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی LS174T

(الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

(ب) تیمار شده با ۴۰ ng/ml پروتئین هیالورید بعد از ۲۴ ساعت

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

#### یافته‌ها

**جدول ۱** با غلظتی از توکسین که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌میرند را نشان می‌دهد. در بین رده‌های سلولی تومورهای هماتوپویتیک، K562 و در بین رده‌های سلولی تومورهای جامد، LS174T بیشترین سیتوتوکسیسیتی را در غلظت ۴۰ ng/ml و در ۲۴ ساعت نشان دادند. DU145، PC-3 و MCF-7 فقط گیرنده با میل ترکیبی را ابراز کردند. این سلول‌ها بیشترین توکسیسیتی 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 محرك کلونی گرانولوسیت - ماکروفاز (GM-CSF)**

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

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

#### ب- MTT

**(Dimethyl Thiazol diphenyl tetrazolium bromide)** به منظور تأیید نتایج حاصل از تریپان بلو، میزان زنده ماندن یا سیتوتوکسیسیتی 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، Layset و GM-CSF، PBS ، در غلظت‌های متفاوت و زمان‌های مختلف به آن‌ها اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از MTT (۰/۰۵ng/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 میکرولیت (Lab system) انجام شد. میزان سیتوتوکسیسیتی هر کدام از گروه آزمون نسبت به کنترل مقایسه شد .

#### سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش سنجش کلونی

۱۰۰۰ سلول از رده‌های مختلف در دیش ۵ سانتی‌متری (Al-GM-CSF ۱۶۰ ng/ml) در دو گروه کنترل و آزمون، 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 آنتی بادی منوکلونال Anti-Goat GM-CSF ۱ ng/ml و (R and D) ۱۰۰ ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و

GM-CSF گیرنده با میل ترکیبی بالای LS174 T، HL60 و MCF-7، PC-3 گیرنده با میل ترکیبی پایین را بیان می کردند (۴، ۲).

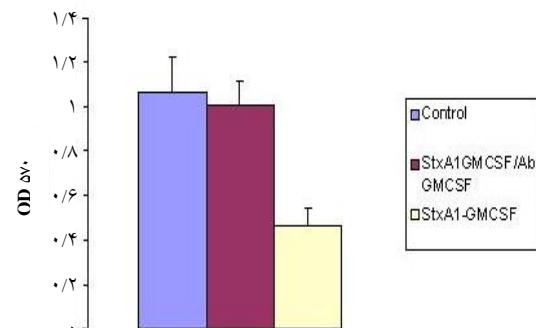
LS174 T و K562 دو رده سلولی بودند که بیشترین حساسیت را نسبت به StxA1-GM-CSF (DT- GM-CSF) در مطالعات قبلی پروتئین هیبریدیفتري (DT- GM-CSF) در غلظت  $18 \text{ ng/ml} \pm 70$  و در مدت ۴۸ ساعت،  $\%50$  (LC50) خاصیت سیتو توکسیسیته پروتئین را بروز داد اما پروتئین هیبرید در مطالعه اخیر در غلظت  $20 \text{ ng/ml}$  در مدت ۲۴ ساعت  $50$  درصد سیتو توکسیسیته را دارا بود (۴).

DT-GM-CSF اثر قابل ملاحظه ای بر K562 نشان نداد اما توکسین هیبرید در غلظت StxA1-GM-CSF  $40 \text{ ng/ml}$  و در ۲۴ ساعت دارای سیتو توکسیسیته نزدیک به  $100$  درصد بود. سیتو توکسیسیته StxA1-GM-CSF در مقایسه با DT- GM-CSF DU937 بر رده های سلولی HL60 و GM-CSF DT-GM-CSF کمتر بود (۴). هر چند در مطالعه ای دیگر که DT-GM-CSF در سیستم باکولو ویروس بیان شده بود، بر روی HL60 در غلظت  $30 \text{ ng/ml}$  تقریباً  $100$  درصد اثر سیتو توکسیسیته وجود داشت اما در این مطالعه در غلظت  $160 \text{ ng/ml}$  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 سیتو توکسیسیته، علاوه بر تفاوت توکسیسیته توکسین دیفتري و شبیگا، می تواند به خاطر استفاده از دو سیستم متفاوت باشد.

سیتو توکسیسیته HL60 در مقایسه با U937 علیرغم این که گیرنده GM-CSF کمتر بیان می دارد، بیشتر بود. همچنین حساسیت متغیری برای DT-GM-CSF (توکسین دیفتري) گزارش شده است که در آن LC50 برای U937  $154$  برابر در مقایسه با HL60 کمتر بود (۴).

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

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



درصد سیتو توکسیسیته در غلظت  $40 \text{ ng/ml}$  برای LS174 T و  $160 \text{ ng/ml}$  برای MCF-7 بعد از یک هفته در سنجش کلونوژنیک، اندکی بیشتر از میزان سیتو توکسیسیته در سنجش MTT بود. ( $58 \pm 3/5$  به  $46 \pm 4$  برای MCF-7 و  $83 \pm 4/3$  به  $88 \pm 4/6$  برای LS174 T).

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 تریبان 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 سیتو توکسیسیته StxA1-GM-CSF در دراز مدت در آن به وجود می آید.

## بحث

در این تحقیق اثر سیتو توکسیسیته پروتئین هیبرید نوترکیب بر ۸ رده سلول سرطانی که گیرنده GM-CSF را بیان می کردند، مورد مطالعه قرار گرفت. این سلول ها عبارت بودند از LCL، K562، U937، HL60، (رده سلول های مشتق از سیستم هماتوپویتیک) 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، GM-CSF گیرنده استفاده شدند.

حضور هم زمان DT-GM-CSF و GM-CSF منجر به کاهش یا بلوکه کردن اثر سیتوتوکسیسته بر رده‌های سلولی که گیرنده GM-CSF را بیان می‌کنند، می‌شود. بنابراین GM-CSF تولید شده توسط این سلول‌ها می‌تواند در غلظت بهینه برای سیتوتوکسیسته تأثیر گذار باشد. رده سلولی GM-CSF، MCF-7 تولید نمی‌کند(۱۸). بنابراین نسبت به DU145 و PC3 حساس‌تر می‌باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا کاربرد این پروتئین هیبرید نوتروکریب در مرحله کارآزمایی بالینی را نشان دهد اما با وجود این، نتایج به دست 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، توکسیستی شدیدتری را بروز می‌دهند. همچنین استفاده از آنتی بادی ضد GM-CSF از اتصال اختصاصی هیبرید به رسپتور اختصاصی ممانعت کرده و از اثر کشنده‌گی 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 انسیتو پاستور ایران که در تهیه برخی از تصاویر سلولی در این مطالعه ما را یاری کرده‌اند قدردانی می‌نمایم.

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

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

اتصال گیرنده با میل ترکیبی بالا( $Kd = 10.50 \text{ pmol/l}$ ) در مقایسه با گیرنده با میل ترکیبی پایین( $Kd = 0.72 \text{ nmol/l}$ ) از قدرت اتصال بالاتری برخوردار است(۶، ۴). 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 سیتوتوکسیسته 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 سیتوتوکسیسته خود را اعمال می‌کند. این پدیده در مورد سایر گیرنده‌ها نیز گزارش شده است(۱۶). علت دیگر سیتوتوکسیسته پایین رده‌های سلولی PC3 و DU145 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, Wagemaier G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34<sup>+</sup> 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. *Irn 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 prostatecancer. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004;10(9): 655-7.
- 13- Williams MD, Rostovtsev A, Narla RK, Uckun FM. Production of recombinant DT<sub>ct</sub>GMSF 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  $\beta$  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.<sup>1</sup> (MS), Oloomi M.<sup>2</sup> (PhD) , Shokrgozar M.A.<sup>3</sup>(PhD) , Shahrokhi N.<sup>2</sup>(MS),  
Mohammadi Roushandeh A.<sup>4</sup> (MS), Kuwahara Y.<sup>5</sup> (PhD), Fukumoto M.<sup>5</sup>(MD-PhD)**

<sup>1</sup> Pasteur Institute of Iran

<sup>2</sup> Pasteur Institute of Iran, Department of Molecular Biology

<sup>3</sup> Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank of Iran(NCBI)

<sup>4</sup> Medical University of Tehran

<sup>5</sup> 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