زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس

کلون‌سازی کاسپاز ۹ در وکتور یوکاریوتی، بررسی بیان و سنجش عملکرد آن در سلول

رقیه حمیدی[۱]، فرنگیس عطایی[۲*]، سامان حسینخانی[۳]

۱-دانشجوی دکتری، رشته بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲-استادیار، رشته بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳-استاد، رشته بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۷۵ تهران، ایران
Ataei_f@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

چکیده

مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده فرایند مهمی است که طی تکامل بدون تغییر باقی مانده است. این فرایند در تنظیم شرایط فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی موثر است. آپوپتوز شناخته شده‌ترین نوع مرگ سلولی است که در بسیاری از تومورها مختل شده و سبب مقاومت به درمان می شود. کاسپاز۹ یکی از پروتئین‌های کلیدی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز است. فعال شدن کاسپاز۹ منجر به فعال شدن کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز۳/۷ شده و با راه اندازی آبشار کاسپازی منجر به مرگ سلول می شود. در این مطالعه، ژن کاسپاز۹ در وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1(+) کلون و عملکرد آن در سلول بررسی شد. ژن کاسپاز۹ طی PCR با پرایمرهای اختصاصی تکثیر و پس از هضم دوگانه با آنزیم‌های *KpnI* و *BamHI* به پلاسمید pcDNA برش خورده الحاق شد. پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تعیین توالی به رده سلولی SH-SY5Y ترنسفکت و با داروی دوکسوروبیسین تیمار شد. عملکرد آن بر مرگ سلولی با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو و PI، و سنجش فعالیت کاسپاز۳ بررسی و بیان آن در سلول با وسترن بلات تایید شد. کلونینگ ژن کاسپاز۹ انجام و بیان آن در سلول با وسترن بلات تایید شد. افزایش بیان کاسپاز ۹ در سلول منجر به پردازش خود بخودی آن طی همودایمریزاسیون و در نتیجه القای مرگ سلولی شده و حساسیت سلول نسبت به دوکسوروبیسین را افزایش و زنده‌مانی سلولی را کاهش داد. ژن کاسپاز۹ کلون شده در سلول فعالیت نشان داد و آپوپتوز را در حضور دوکسوروبیسین از طریق خود فعال‌سازی و متعاقبا تشدید فعال‌سازی کاسپاز۳ افزایش داد.

کلید واژگان: کلونینگ، کاسپاز۹، آپوپتوز، دوکسوروبیسین

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

۱- مقدمه

مرگ سـلولی برنامه‌ریزی شـده یا آپوپتوز[1] برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ توسط Currie و همکارانش تعریف شد[۱, ۲]. آپوپتوز نوع رایجی از مرگ سلولی است که با تغییرات مورفولوژیکی همراه بوده و در انواع مختلفی از بافت‌ها و سلول‌ها مشاهده شده است[۲]. آپوپتوز بخشی ضروری از حیات یک ارگانیسم چند سلولی است و نقش مهمی در توسعه و هومئوستاز بافت‌ها بازی می‌کند. اختلال در این فرایند منجر به بیماری های مختلفی همچون سرطان، بیماری‌های عصبی و بیماری‌های خود ایمنی می شود[۳]. وقایع بیوشیمیایی در فرایند آپوپتوز منجر به تغییرات مورفولوژیکی در سلول و نهایتا مرگ می‌شود. این تغییرات مورفولوژیکی شامل کوچک شدن و چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و قطعه قطعه شدن اسیدنوکلئیک، قطعه قطعه شدن غشا و ایجاد اجسام آپوپتوتیک، برآمدگی‌ها و تغییرات سطح غشا است که نهایتا منجر به پاکسازی سلول‌های مرده توسط فاگوسیت‌ها می شود[٤]. دو مسیر متفاوت برای آپوپتوز وجود دارد. مسیر خارجی آپوپتوز (extrinsic apoptosis) که از طریق گیرنده های مرگ در سطح سلول شروع می‌شود و مسیر داخلی یا میتوکندریایی (intrinsic apoptosis) که با رهایش سیتوکروم c از میتوکندری همراه است. در مسیر داخلی، سیتوکروم c پس از رهایش از میتوکندری به پروتئین Apaf-1 متصل و منجر به الیگومریزاسیون آن و تشکیل یک کمپلکس هفت زیر واحدی به نام آپوپتوزوم می شود. کاسپاز ۹ با اتصال به این کمپلکس فعال شده و متعاقبا کاسپاز۳ را در یک آبشار کاسپازی فعال کرده و در نهایت منجر به مرگ سلول از طریق آپوپتوز می‌شود[۵, ٦]. با هدف دسترسی به ژن کاسپاز برای مطالعات مرتبط با سیگنالینگ آپوپتوزی در آینده، در مطالعه حاضر ژن کاسپاز ۹ در وکتور بیانی یوکاریوتی کلون و با توالی‌یابی تایید شد. برای تایید عملکردی بودن این ژن، تاثیر بیان آن بر مرگ سلولی القا شده با داروی دوکسوروبیسین در رده سلولی SH-SY5Y ارزیابی و بیان ژن هدف با وسترن بلات بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

برای انجام کلونینگ، ابتدا وکتور تکثیری pQE حاوی ژن کاسپاز ۹ انسانی موجود در آزمایشگاه از باکتری *E.coli* DH5α با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Geneall در مقیاس کم استخراج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای طراحی پرایمرها، توالی ژن کاسپاز ۹ را از GenBank گرفته و با استفاده از نرم افزار Oligo7 یک جفت پرایمر به همراه جایگاه‌های برش *KpnI* و *BamHI* طراحی شد (جدول ۱). پرایمر های طراحی شده توسط شرکت ماکروژن کره سنتز شد.

برای تکثیر ژن کاسپاز ۹ واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)با پلاسمید حامل ژن به‌عنوان الگو، آنزیم پلیمراز Pfu و پرایمرهای سنتز شده انجام شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر و بررسی کیفیت و سایز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ در صد، فرایند پاکسازی محصول PCR با استفاده از کیت PCR clean-up شرکت Geneall انجام شد.

جدول ۱ توالی پرایمرهای طراحی شده برای کلونینگ ژن کاسپاز ۹

نام پرایمر	توالی
پیشرو(KpnI)	5’-CTAGGTACCATGGACGAAGCGGATCGG-3’
پسرو (BamHI)	5’-CGCGGATCCTCATGATGTTTTAAAGAAAAG-3’

[1] apoptosis

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

سپس، این قطعه و پلاسمید pcDNA3.1(+) به‌صورت جداگانه و با دو آنزیم برشی *KpnI* و *BamHI* مطابق با پروتکل پیشنهادی شرکت Fermentase طی یک واکنش هضم دوگانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ ساعت برش داده شدند تا در نهایت دارای انتهای چسبنده در دو انتهای '5 و '3 شوند. سپس، این قطعه غیرفعال و پاکسازی شده و واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4 DNA-ligase با نسبت ۳ به ۱ از قطعه ژن و پلاسمید برش خورده در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت حدود ۲ ساعت و سپس دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انجام شد. محصول واکنش الحاق، با روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E.coli* سویه DH5α انتقال یافت و روی پلیت LB–آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. سپس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا کلونی‌ها ظاهر شود. برای ارزیابی کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، از کلونی‌های ظاهر شده روی پلیت نمونه‌برداری شد و به‌عنوان الگوی PCR در تست colony-PCR استفاده شد. محصول colony-PCR برای ارزیابی باند بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. سپس، پلاسمید نوترکیب از یکی از کلونی‌های مثبت استخراج و به همراه وکتور کنترل بدون ژن برای ارزیابی بیشتر، با آنزیم‌های برشی *KpnI* و *BamHI* هضم و بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد[۷]. برای ارزیابی و تایید نهایی، پلاسمید نوترکیب به دست آمده با پرایمر CMV-F توسط شرکت ماکروژن کره توالی‌یابی شد.

پلاسمید pcDNA3.1(+) نوترکیب حاوی ژن کاسپاز ۹ (pcDNA/C9) انسانی با استفاده از حامل شیمیایی پلی اتیلن ایمین (PEI) و N/P=8 به رده سلولی نوروبلاستومای انسانی SH-SY5Y ترنسفکت شد. برای ارزیابی اثر کاسپاز ۹ بر مرگ سلولی از داروی دوکسوروبیسین (DOX) استفاده شد. بدین منظور رده سلولی مورد نظر در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین–استرپتومایسین و ۵ درصد CO2 کشت داده شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم و مورفولوژی مناسب، محیط روی سلول‌ها با محیط فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک تعویض شده و با pcDNA/C9 ترنسفکت شد. ٢٤ ساعت پس از ترنسفکشن، سلول با داروی DOX با غلظت ۱ میکرومولار تیمار و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. پس از تیمار با دارو، مورفولوژی سلول با استفاده از میکروسکوپ بررسی شد.

برای تایید فرایند مرگ سلولی، از روش رنگ‌آمیزی سلول با رنگ های Trypan Blue و Propidium iodide (PI) استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی با Trypan Blue 1mM، سلول با تریپسین از کف پلیت جدا شده و پس از شستشو با بافر PBS، از سوسپانسیون حاصل از هر نمونه ۱۰ میکرولیتر به ویال حاوی ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو اضافه و به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. تریپان بلو از طریق غشای آسیب دیده به درون سلول‌های مرده نفوذ کرده و موجب آبی رنگ شدن آنها می شود. در نهایت، تعداد سلول‌های زنده و مرده با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ شمارش شده و درصد سلول‌های زنده برای هر نمونه محاسبه شد.

یکی دیگر از روش های رنگ‌آمیزی برای بررسی مرگ سلولی استفاده از رنگ فلورسنت Propidium iodide است. این رنگ به دلیل وجود ید در ترکیب آن قرمز رنگ است و نور با طول موج ۵۳۵ نانومتر (محدوده رنگ سبز) را جذب کرده و باز نشری در محدوده ٦٢٠ (محدوده قرمز) نانومتر دارد[۸]. این رنگ از غشای سلول‌های غیر زنده مانند غشای آسیب دیده حاصل از آپوپتوز عبور کرده، با اتصال به اسید نوکلئیک ویژگی فلورسنتی آن ۲۰ تا ۳۰ برابر افزایش یافته و باعث قرمز دیده شدن هسته سلول‌های آسیب دیده و آپوپتوزی می‌شود. برای این تست، بعد از ترنسفکشن و تیمار دارویی، سلول‌ها با PBS

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

شسته شده و با رنگ PI بمدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس مجددا ۲ تا ۳ بار با بافر PBS شسته و با میکروسکوپ فلورسنت و دستگاه Cytation™ 3 از سلول‌ها عکس‌برداری شد.

یکی از فاکتورهای مهم در ردیابی مرگ سلولی آپوپتوز، سنجش فعالیت کاسپاز۳ است[۹]. برای این کار، سلول‌ها با تریپسین از کف پلیت جدا شده و پس از شستشو با بافر PBS با استفاده از بافر هایپوتونیک روی یخ لیز شدند. سوسپانسیون به‌دست آمده در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی به‌دست آمده با استفاده از روش استاندارد بردفورد تعیین غلظت شد. سپس، فعالیت کاسپاز۳ با استفاده از غلظت یکسان از هر نمونه لیزشده با استفاده از کیت سنجش فعالیت کاسپاز۳ به روش فلورسانس (ac-DEVD-AMC/ Enzo life science) اندازه‌گیری شد.

در ادامه برای بررسی بیان کاسپاز ۹ در سلول‌های ترنسفکت شده با وکتورهای pcDNA و pcDNA/C9 و همچنین، ردیابی تغییرات آن از فرم پروکاسپاز (procaspase 9) به فرم برش خورده (Caspase 9)، از تکنیک وسترن بلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال علیه کاسپاز ۹ و آنتی‌بادی علیه بتا-اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد[۹].

۳- نتایج

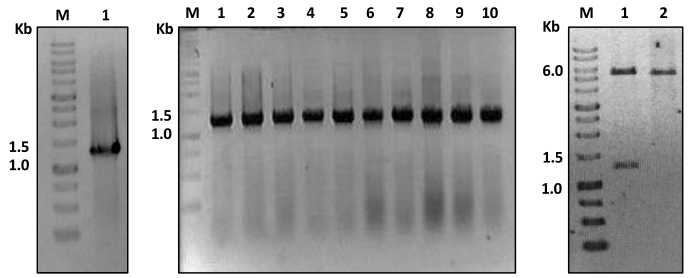
در این پژوهش ژن کاسپاز ۹ در وکتور pcDNA کلون شد. پس از تایید توالی، وکتور pcDNA/C9 به رده سلولی SH-SY5Y ترنسفکت شد و اثر داروی دوکسوروبیسین در القای مرگ سلولی بررسی شد. برای کلونینگ ژن کاسپاز ۹ انسانی در وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA، پرایمر اختصاصی ژن کاسپاز ۹ به همراه جایگاه‌های برش مناسب در پرایمر فوروارد طراحی شد (جدول ۱). سپس، واکنش PCR برای تکثیر ژن هدف انجام شد.

همان طور که در شکل ۱- الف دیده می‌شود ژن مورد نظر با کیفیت مناسب و به‌صورت تک باند تکثیر یافته و در محدوده وزنی مناسب (طول توالی کاسپاز ۹ انسانی ۱۲۵۱ جفت باز می‌باشد) قرار دارد. محصول PCR پاکسازی شده و پلاسمید pcDNA تحت تاثیر آنزیم‌های برشی *KpnI* و *BamHI* مورد هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفت. پس از واکنش الحاق بین ژن هدف و وکتور، محصول واکنش به باکتری مستعد *E.coli* سویه DH5α انتقال داده شد. ایجاد کلونی‌ها بر روی محیط کشت LB-آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌تواند نشان‌دهنده انتقال موفق پلاسمید الحاق شده به ژن هدف باشد.

برای ارزیابی کلونی‌های دارای پلاسمید نوترکیب، واکنش colony-PCR با پرایمر اختصاصی کاسپاز ۹ برای تعدادی از کلونی‌ها انجام شد و نتیجه حاصل از واکنش PCR وجود باند با اندازه تقریبی ۱۲۵۰ جفت باز برای تمام کلونی‌های انتخاب شده را بر روی ژل آگاروز نشان داد (شکل ۱- ب) که تایید اولیه ای بر وجود پلاسمید نوترکیب حاوی ژن بیان‌کننده کاسپاز ۹ در آنها بود. پس از استخراج پلاسمید نوترکیب از یکی از کلونی‌ها، حضور توالی الحاق یافته با استفاده از واکنش هضم دوگانه توسط آنزیم‌های برشی بررسی شد و هم‌زمان با وکتور کنترل بدون ژن بررسی و تایید شد (شکل ۱- ج). برای تایید نهایی کلونینگ ژن هدف در پلاسمید و اطمینان از عدم وجود جهش احتمالی در توالی کلون شده، پلاسمید نوترکیب حاصل، تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی نشان داد که ژن مورد نظر به‌صورت صحیح بین جایگاه‌های *KpnI* و *BamHI* در پلاسمید وارد شده و فاقد جهش است.

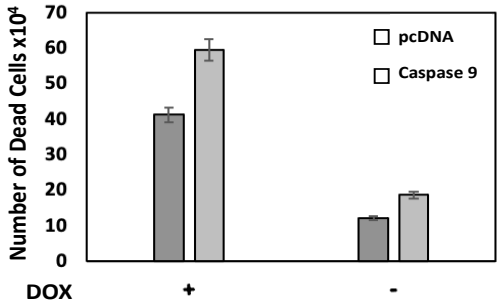
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]



الف ب ج

شکل ۱ ژل آگاروز مراحل مختلف کلونینگ. **الف)** PCR ژن کاسپاز ۹. M: مارکر DNA، ۱: محصول PCR. **ب)** کلونی-PCR. M: مارکر DNA، ۱-۱۰: محصول PCR مربوط به غربالگری ۱۰ کلونی مختلف. **ج)** هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب و پلاسمید فاقد ژن (کنترل). M: مارکر DNA، ۱: محصول هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب از یک کلونی مثبت در شکل ب: شامل یک باند در محدوده ۵ تا ٦ کیلو جفت بازی (پلاسمید) و یک باند در محدوده ۱ تا ۱,۵ کیلو جفت بازی (کاسپاز ۹)، 2: محصول هضم دوگانه پلاسمید فاقد ژن به‌عنوان کنترل: شامل یک باند در محدوده ۵ تا ٦ کیلو جفت بازی (پلاسمید).

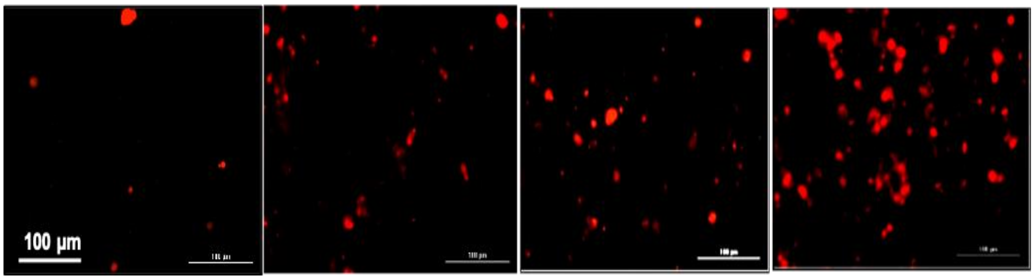


شکل ۲ شمارش سلول‌های رنگ شده با تریپان بلو در نمونه‌های ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA/C9 و نمونه‌های ترنسفکت شده با pcDNA به‌عنوان کنترل، پس از تیمار با ۱ میکرومولار DOX به مدت ٢٤ ساعت.

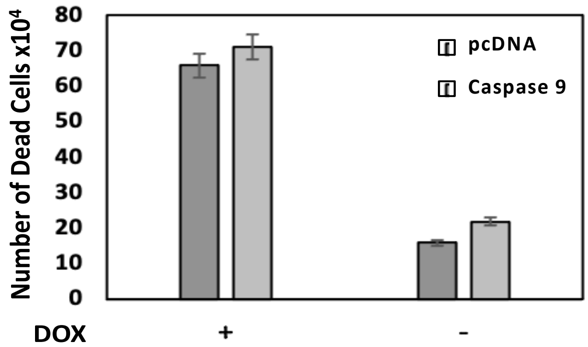
برای بررسی عملکرد و فعال بودن پروتئین حاصل از ژن کلون شده، پلاسمید نوترکیب pcDNA/C9 با استفاده از حامل پلی اتیلن ایمین به سلول‌های SH-SY5Y ترنسفکت شد تا اثر بیان پروتئین کاسپاز ۹ بر میزان آپوپتوز در این رده سلولی در حضور و عدم حضور داروی دوکسوروبیسین (DOX) ارزیابی شود. تست رنگ‌آمیزی سلول با استفاده از Trypan Blue نشان داد که در نمونه های ترنسفکت شده با pcDNA/C9 در مقایسه با سلول‌های کنترل ترنسفکت شده با پلاسمید بدون ژن pcDNA، درصد بیشتری از سلول‌ها دچار مرگ شده‌اند و این میزان در نمونه‌های تیمار شده با داروی DOX افزایش قابل توجهی یافته است (شکل ۲). علاوه بر این، میزان مرگ سلولی القاشده در اثر بیان کاسپاز ۹ در حضور و عدم حضور داروی دوکسوروبیسین در این سلول‌ها با رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت PI بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که مرگ سلولی در نمونه‌های ترنسفکت شده با کاسپاز ۹ در مقایسه با سلول‌های کنترل بیشتر است و تیمار با داروی DOX باعث افزایش بیشتر مرگ سلولی در نمونه‌های ترنسفکت شده با کاسپاز ۹ می شود (شکل۳ و ٤).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]



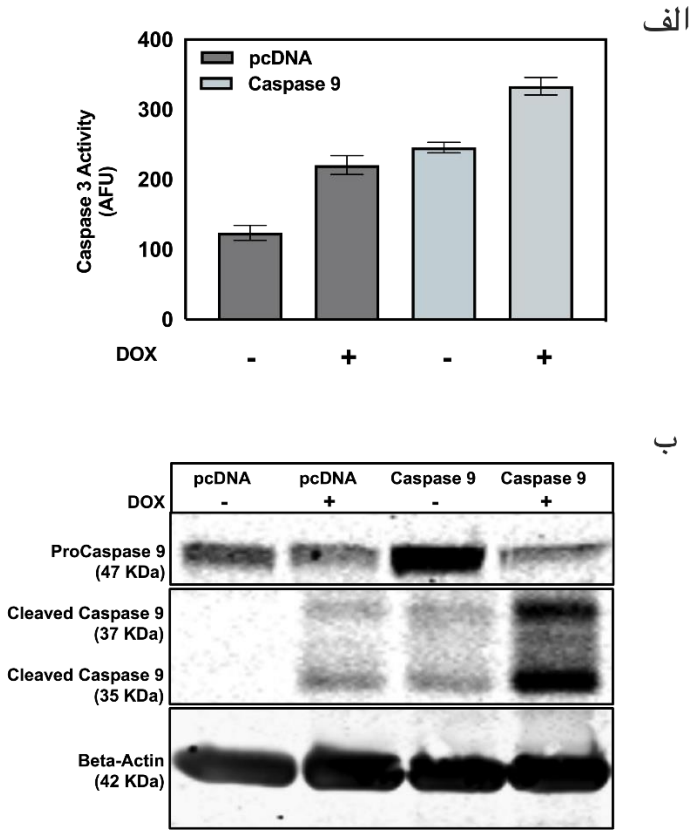
شکل ۳ رنگ‌آمیزی سلول با رنگ PI. ۱) سلول‌های ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA (کنترل) تیمار نشده، ۲) سلول‌های ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA تیمار شده با غلظت ۱ میکرومولار از داروی دوکسوروبیسین (DOX). ۳) سلول‌های ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA/C9 تیمار نشده، ٤) سلول‌های ترنسفکت شده با پلاسمید pcDNA/C9 تیمار شده با غلظت ۱ میکرومولار از داروی DOX.



شکل ٤ شمارش سلول‌های مرده از طریق رنگ‌آمیزی PI. سلول‌های ترنسفکت شده با pcDNA/C9 و ترنسفکت شده با pcDNA کنترل پس از تیمار با یک میکرومولار DOX به مدت ٢٤ ساعت.

نتایج رنگ‌آمیزی با PI، مطابق با نتایج حاصل از تست تریپان بلو نشان داد که ژن کاسپاز ۹ کلون شده پس از بیان عملکرد منا سبی در سلول القا کرده و ساختار منا سب و فعال را دارا می‌باشد. نتایج حاصل از سنجش فعالیت کاسپاز۳، در تایید با نتایج رنگ‌آمیزی تریپان بلو و PI، نشان داد که افزایش بیان کا سپاز ۹ همانند تیمار با داروی DOX باعث القای مرگ شده و ترکیب این دو باعث هم‌افزایی سیگنال مرگ سلولی می‌شود (شکل ۵–الف). در بررسی میزان بیان کا سپاز ۹ با وسترن بلات، بیان پروتئین در سلول تایید شد (شکل ۵–ب). همچنین تاثیر افزایش بیان کا سپاز ۹ در سلول در حضور و عدم حضور داروی DOX بر میزان برش کاسپاز ۹ که نشان دهنده تبدیل پروکاسپاز به کاسپاز فعال هست و به‌عنوان یک مارکر القای مرگ محسوب می شود مشخص شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]
[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]



شکل ۵ سنجش فعالیت کاسپاز ۳ و بررسی بیان کاسپاز ۹. **الف)** سنجش فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های ترنسفکت شده با pcDNA/C9 و pcDNA کنترل قبل (-) و پس از تیمار با یک میکرومولار DOX (+) به مدت ٢٤ ساعت. **ب)** وسترن بلات و بررسی سطح بیان کاسپاز ۹ قبل و بعد از تیمار با دارو در سلول‌های ترنسفکت شده با آنتی‌بادی اختصاصی علیه کاسپاز ۹ و بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی.

٤- بحث

آپوپتوز نقش مهمی در هومئوستاز بافت‌ها ایفا می‌کند و اختلال در این فرایند منجر به بیماری‌های متنوعی می‌شود[۳]. دو مسیر متفاوت برای آپوپتوز وجود دارد: مسیر خارجی آپوپتوز که از طریق گیرنده‌های مرگ در سطح سلول شروع می‌شود و مسیر داخلی که با آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری همراه است. سیتوکروم c پس از آزاد شدن از میتوکندری به پروتئین سیتوپلاسمی Apaf-1 اتصال یافته و منجر به تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم می‌شود. کاسپاز ۹ با اتصال به کمپلکس آپوپتوزوم فعال شده و منجر به فعال شدن کاسپاز۳ شده و در نهایت منجر به مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود[۵]. این فرایند در روند طبیعی سلول‌ها وجود دارد و میزان فعالیت این مسیر در طی روند درمان بیماری ها حایز اهمیت است.

در مطالعه حاضر از پلاسمید pcDNA3.1(+) به‌عنوان سیستمی کارآمد در بیان پروتئین‌ها در سیستم یوکاریوتی استفاده شد و طی مراحل کلونینگ ژن کاسپاز ۹ از وکتور تکثیری pQE به وکتور بیانی pcDNA3.1(+) ساب کلون و با تعیین توالی تایید شد. بیان ژن کلون شده در سلول یوکاریوتی SH-SY5Y با روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی علیه کاسپاز ۹ تایید شد. برای بررسی عملکردی بودن این نمونه کلون شده، پلاسمید نوترکیب به سلول‌های SH-SY5Y ترنسفکت شد و با داروی دوکسوروبیسین که القا کننده آپوپتوز است تیمار شد. نتایج حاصل از تست‌های رنگ‌آمیزی تریپان بلو (شکل ۲)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

و پروپیدیوم یدید (شکل ۳ و ٤)، سنجش فعالیت کاسپاز۳ و وسترن بلات برای کاسپاز ۹ (شکل ۵) نشان داد که افزایش بیان کاسپاز ۹ و تیمار با داروی DOX به‌صورت جداگانه منجر به مرگ سلولی شده اما شدت اثر هم‌زمان آنها در القای مرگ بیشتر است که تاییدکننده عملکرد مناسب پروتئین کاسپاز ۹ بر اثر دارو می باشد. پژوهش های پیشین نتایج مشابهی در ارتباط با اثر افزایش بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند Apaf-1 در افزایش حساسیت سلول به القای مرگ با القا کننده‌های مرگ مانند دوکسوروبیسین و تاکسل‌ها (Taxels) ارائه داده‌اند[۱۰, ۱۱]. علاوه بر این مطالعات پیشین اهمیت بیان و فعالیت کاسپاز ۹ در شیمی درمانی سلول‌های نوروبلاستوما نوع S از طریق تحریک گیرنده‌های CD95/Fas را نشان داده اند[۱۰]. همچنین با توجه به مطالعات گزارش شده، افزایش بیان کا سپاز ۹ در سلول منجر به همودایمر شدن این پروتئین و فعال شدن آن به‌صورت خود به خودی و در نتیجه القای سیگنالینگ مرگ سلولی از طریق آبشار کا سپازی می شود[۱۲]. این همودایمر شدن و فعال شدن خود به خودی کاسپاز ۹ در نتایج وسترن بلات (شکل ۵–ب) به صورت باندهای ضعیفی از کا سپاز ۹ برش خورده (۳۷ و ۳۵ کیلو دالتون) مشهود است. همزمانی این اثر به همراه داروی DOX منجر به افزایش فرایند پردازش پروکا سپاز ۹ و در نتیجه افزایش شدت باندهای ۳۷ و ۳۵ کیلو دالتونی در و سترن بلات شد (شکل ۵–ب). افزایش پردازش پروکاسپاز ۹ تحت تاثیر DOX منجر به افزایش فعال سازی کاسپاز۳ و تشدید مرگ سلولی شده است. در واقع این ژن با اهداف مختلف از جمله ساخت سنسورهای سلولی و بررسی اثر داروهای مختلف بر سیگنالینگ مرگ سلولی آپوپتوز در تحقیقات آینده کلون و تایید شد.

۵- نتیجه‌گیری

ژن کاسپاز۹ در وکتور یوکاریوتی کلون شد. پس از تایید توالی، به رده سلولی یوکاریوتی SH-SY5Y انتقال یافت. سلول ترنسفکت شده با ژن کا سپاز۹ در حضور و عدم حضور دارو ارزیابی شد و نتایج نشان داد که این پروتئین باعث افزایش اثر داروی دوکسوروبیسین بر میزان مرگ سلولی شده و تایید شد که کاسپاز۹ بیان شده عملکرد لازم را در آلقای آپوپتوز دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از بهاره علیزاده که همکاری داشته است تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان:رقیه حمیدی (نویسنده اول)، پژوهشگر ا صلی/ نگارنده مقدمه/ روش شناس/ نگارنده بحث (٤٠ ٪)

فرنگیس عطائی (نویسنده دوم)، روش شناس/ پژوهشگر اصلی/ تحلیل گر آماری/ نگارنده بحث (٤٠ ٪)

سامان حسینخانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/روش شناس/تحلیلگر آماری (۲۰٪)

منابع مالی: مطالعه حاضر با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

٦- منابع

[1] Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;

[2] Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biology and Therapy. 2005.

[3] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008.

[4] Häcker G. The morphology of apoptosis. Cell and Tissue Research. 2000.

[5] Hongmei Z. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review. In: Apoptosis and Medicine. 2012.

[6] Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES, et al. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. EMBO J. 2001;

[7] Tirmomenin M, Ataei F, Hosseinkhani S. Cloning of human survivin in pET-28a and its

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

protein expression study in E.coli BL21(DE3). Modares J Biotechnol [Internet]. 2020 Oct 10 [cited 2021 Apr 25];11(3):0–0. Available from: https://biot.modares.ac.ir/article-22-41661-en.html
[8] Mehdizadeh K, Ataei F, Hosseinkhani S. Effects of doxorubicin and docetaxel on susceptibility to apoptosis in high expression level of survivin in HEK and HEK-S cell lines as in vitro models. Biochem Biophys Res Commun. 2020;
[9] Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. N Am J Med Sci. 2012;
[10] Bian X, Giordano TD, Lin HJ, Solomon G, Castle VP, Opipari AW. Chemotherapy-induced Apoptosis of S-type Neuroblastoma Cells Requires Caspase-9 and Is Augmented by CD95/Fas Stimulation. J Biol Chem. 2004;
[11] Mehdizadeh K, Ataei F, Hosseinkhani S. Treating MCF7 breast cancer cell with proteasome inhibitor Bortezomib restores apoptotic factors and sensitizes cell to Docetaxel. Med Oncol. 2021;
[12] Silke J, Hawkins CJ, Ekert PG, Chew J, Day CL, Pakusch M, et al. The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. J Cell Biol. 2002;

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]

Cloning of Caspase 9 in eukaryotic vector, investigation of its expression and functional assay in cell

Roghaye Hamidi[1], Farangis Ataei[2]*, Saman Hosseinkhani[3]

1. PhD student, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Assistant professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Ataei_f@modares.ac.ir

Receipt: 2022/02/26 Accepted: 2022/04/12

Abstract

Programmed cell death is a vital cellular process that is highly conserved in evolution. Apoptosis, as a common mode of programmed cell death, is disturbed in the most human malignancies and leads the resistance of cancers to current treatment strategies. Caspase 9 is a key protein in mitochondrial apoptosis. Activated Caspase 9 leads to activation of Caspase 3/7, initiating a caspase cascade and killing cell. In this study, Caspase 9 gene was cloned into pcDNA3.1 (+) and its expression and function evaluated in cell. PCR amplification of Caspase 9 was performed by specific primers and ligated into pcDNA3.1 (+) after double-digestion with *KpnI* and *BamHI*. After sequencing, pcDNA/Caspase 9 was transfected into SH-SY5Y cells and treated with doxorubicin. Caspase 9 function was determined by its effect on cell death level by trypan blue and PI staining, and Caspase 3 activity, and its expression in cells measured by western blotting. Caspase 9 gene cloning was done and its expression in cell was defined by western blot. Overexpression of Caspase 9 led to autoprocessing following homodimerization and induction of cell death and also increased cell sensitivity to doxorubicin treatment and declined cell viability. The cloned Caspase 9 was functional in cell and enhanced apoptosis in the treated cells by doxorubicin through self-activation and subsequently amplification of Caspase 3 activation.

Keywords: Cloning, Caspase 9, Apoptosis, Doxorubicin.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2025-01-07]

[DOR: 20.1001.1.23222115.1401.13.3.12.9]