مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره چهارم (پیاپی ۵)، زمستان ۱۳۸۸
صفحات ۲۲۶ - ۲۱۷

Original Article

مطالعه بیان پروتئین core+1 ویروس هپاتیت C توسط روش میکروسکوپی هم کانون

حسن نوربازرگان[۱]، عطیه هاشمی[۲]، فاطمه متولی[۳]، محمدرضا آقاصادقی[۴]، دکتر آرش معمارنژادیان[۴]، دکتر مهدی آسمار[۵]، دکتر فرزین روحوند[*۶]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، [۲]مربی، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
[۳]کارشناس ارشد، بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران، [۴]استادیار، گروه هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران
[۵]استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، گروه میکروبیولوژی، [۶]استادیار، بانک ژن نوترکیب ایران، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین جدیدی تحت عنوان پروتئین F یا core+1 شناخته شده است که توسط ژنوم ویروس هپاتیت C (HCV) کد می‌شود. عملکرد این پروتئین هنوز مشخص نشده است، اما به نظر می‌رسد در سیکل زندگی و بیماری زایی ویروس نقش مهمی را داشته باشد. در این مطالعه کلون سازی و بیان ژن core+1 HCV در سیستم یوکاریوتی مورد بررسی قرار گرفت تا نقش این پروتئین در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و مقاومت ویروس به درمان بررسی گردد.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژن core+1 داخل پلاسمید pIVEX2.3 به عنوان یک ناقل پروکاریوتی کلون شد. در ادامه توالی نوکلئوتیدی core+1 6XHis-tag حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در سایت‌های آنزیمی NheI/BamHI داخل وکتور یوکاریوتی pcDNA3.1(+) کلون شد. این پلاسمید به وسیله تجزیه آنزیمی و توالی یابی مورد تائید قرار گرفت. پس از ساخته شدن رده سلول کبدی Huh7 به وسیله‌ی روش الکتروپوریشن و لیپوفکشن ترانسفکت شدند. با ترانسفکشن هم زمان پلاسمید pEGFP-N1 و با تکنیک فلوسایتومتری بازده ترانسفکشن مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بیان و چگونگی استقرار پروتئین core+1 در سلول توسط میکروسکوپ هم کانون ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت مراحل کلونینگ را نشان داد. آنالیز فلوسایتومتری بازده بالای روش الکتروپوریشن را در مقایسه با لیپوفکشن برای ترانسفکشن سلول‌های Huh7 نشان داد. هم‌چنین بیان پروتئین core+1 در سلول‌های Huh7 با استفاده از آنتی‌بادی anti-His و میکروسکوپ هم کانون مورد تائید قرار گرفت.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش بیان یوکاریوتی پروتئین core+1 در سلول‌های Huh7 را نشان داد که به این ترتیب می‌تواند، که ابزار مناسبی را برای مطالعه نقش تداخلی پروتئین در مسیرهای سیگنالینگ سلولی و برهم کنش آن با سایر پروتئین‌ها را در اختیار ما قرار دهد.

کلمات کلیدی: هپاتیت C، پروتئین core+1، سلول Huh7

دریافت مقاله: مهر ۱۳۸۸ پذیرش برای چاپ: آذر ۱۳۸۸

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز، بانک ژن نوترکیب ایران
پست الکترونیک: rfarzin@pasteur.ac.ir و farzin.roohvand@gmail.com
تلفن: ۶۶۹۶۹۲۹۱-۰۲۱، دورنگار: ۶۶۹۶۹۲۹۱-۰۲۱

مقدمه

ویروس هپاتیت C(HCV) عامل اصلی بیماری کبدی مزمن است که می‌تواند منجر به، سیروز کبدی و در بعضی موارد سرطان شود. بیش از ۱۷۰ میلیون نفر در جهان به شکل مزمن به این ویروس آلوده هستند. ۱۵ تا ۲۰ درصد بیمارانی که در مرحله حاد قرار دارند به‌طور خود به خود بهبود می‌یابند اما در اکثر موارد بیماری به سمت فاز مزمن و در نهایت منجر به سرطان سلول‌های کبدی می‌شود (۱). هنوز هیچ واکسن یا درمان سیستمیک موثری برای این بیماری شناخته نشده است. تنها درمان موجود، توام درمانی با ریباورین و اینترفرون آلفا (IFN-α) می‌باشد که به دلیل موتاسیون مقاومتی ویروس و عوارض جانبی چندان موثر نیست (۲).

HCV یک ویروس پوشش دار است که به جنس *Hepacivirus* و خانواده *Flaviridae* تعلق دارد. ژنوم آن RNA تک رشته‌ای مثبتی (۹/۶kb) است که یک پلی پروتئین به طول ۳۰۰۰ آمینواسید راکد می‌کند. IRES (Internal ribosome entry site) کنترل ترجمه از ژنوم ویروس را بر عهده دارد. پلی پروتئین تولید شده توسط پروتئازهای سلولی و ویروسی به ده پروتئین ساختمانی (P1، E1، E2 و C) و غیرساختمانی (NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A و NS5B) تقسیم می‌شوند (۳). به علت عدم وجود مکانیسم تصحیح خطا (Proof reading) در عملکرد آنزیم RNA پلی‌مراز در زمان تکثیر HCV، این ویروس در بدن افراد مبتلا دچار تغییراتی در ساختار ژنتیکی خود می‌شود و زیرتیپ‌های جدیدی تولید می‌کند که می‌توانند به سرعت منجر به ایجاد مقاومت گردد. این ویروس به بیش از ۷ ژنوتیپ و بیش از ۱۰۰۰ زیرتیپ تقسیم می‌شود (۳).

پروتئین هسته یا core بعد از برش ابتدایی پلی‌پروتئین ساخته شده توسط ویروس فرم نابالغ پروتئین core با ۱۹۱ آمینواسید تشکیل می‌شود (p23) که توسط پروتئاز SPP (سیگنال پپتید پپتیتاز) داخل غشایی پردازش می‌شود و فرم بالغ این پروتئین با ۱۷۴ آمینواسید (p21) تشکیل می‌گردد (۴).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ژن مولد پروتئین هسته در ویروس هپاتیت C علاوه بر پروتئین فوق، پروتئین دیگری در یک ORF (open reading frame) جدید نیز تولید می‌کند. ترتیب قرارگرفتن نوکلئوتیدها در این پروتئین جدید نسبت به ORF پروتئین قبلی به صورت +۱ تغییر می‌کند (core+1 ORF). پروتئین جدید با نام‌های ARFP (Alternative reading frame protein)، پروتئین F (Frameshift) یا core+1 (که نشان دهنده جایگاه ORF جدید است) خوانده می‌شود. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که پروتئین Core+1 در شکل‌های متفاوتی وجود دارد. دلیل اصلی وجود این پروتئین‌ها تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آن ها می‌باشد که با پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی علیه این پروتئین ها در بیماران مبتلا به هپاتیت C همراه است (۵).

یکی از شکل‌های پروتئین core+1 پروتئین کایمریکی (chimeric) با طول ۱۶۱ آمینواسید است که ۸ تا ۱۱ آمینواسید ابتدایی آن مربوط به پروتئین هسته (Core) و بقیه مربوط به ORF جدید می‌باشد (core+1/F). تغییر چارچوب ریبوزومی (Ribosomal Frameshift) در اثر لغزش ریبوزوم در زمان ترجمه در ناحیه غنی از آدنین در بین کدون های ۸-۱۱ اتفاق می‌افتد که منجر به تولید این پروتئین در ژنوتیپ HCV-1a می شود (۶).

شکل دیگر پروتئین Core+1، core+1/S نامیده می‌شود که شروع ترجمه آن از کدون داخلی ـ کدون متیونینی که داخل ORF (core+1) وجود دارد (85/87 AUG) ـ اتفاق می افتد و منجر به تشکیل قطعه کوتاه تری بین اسیدآمینه های ۷۴ تا ۷۶ می‌شود (۷).

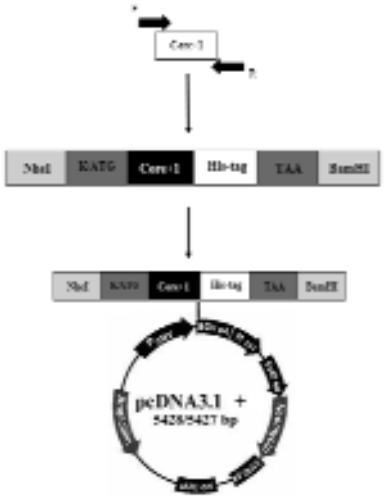
باز هم شکل دیگری از پروتئین core+1 در ژنوتیپ HCV-1b تولید می‌شود که در اثر دو تغییر چارچوب مجزا به وجود می‌آید، به این صورت که اولین تغییر قالب خواندن در کدون ۴۲ به صورت +۱ و دیگری در کدون پایان core+1 ORF در جایگاه ۱۴۴ به صورت -۱ اعمال می‌شود و به ORF اولیه خود بر می‌گردد (۸). عملکرد پروتئین F به وضوح شناخته نشده است اما ممکن است که در همانند سازی، ورود، ریخت زایی، بیماری زایی، سرهم بندی و در آخر پیشبرد افراد به سمت فازهای پیشرفته بیماری نقش داشته باشد (۵، ۷، ۸ و ۹). بسیاری از مطالعات جدید نشان داده اند که میزان بیان ARFP ها در بیماران مبتلا در مرحله وخیم و سیروز کبدی و سرطان (HCC) بسیار بالاتر است و آنتی بادی‌ها و پاسخ‌های ایمنی سلول‌های T علیه این پروتئین‌ها به میزان بسیار گسترده‌ای وجود دارند. به علاوه تمامی سکانس‌هایی از HCV که

عفونت‌زا هستند دارای ARF به صورت شیفت ریبوزمی می‌باشند (۱۰). پروتئین F با تحریک تولید کموکین‌های موثر در مسیرهای تولیدکننده فیبرین (مثل IL-8 و IL-6) باعث صدمه به بافت‌های کبدی می‌شود (۱۱) و هم چنین می‌تواند مسیر سیگنالینگ NF-KB را در پاسخ به TNF-α فعال کند (۱۲).

از آن‌جایی که پروتئین core+1 می‌تواند در بیماری‌زایی HCV و همچنین در مقاومت به درمان با اینترفرون آلفا نقش داشته باشد، هدف از این مطالعه طراحی و ساخت پلاسمید بیان کننده پروتئین core+1 در سلول‌های یوکاریوتی است تا بتوان در مطالعات بعدی نقش این پروتئین را در بیماری‌زایی ویروس و مسیرهای سیگنالینگ سلول مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

الف) طراحی پلاسمید و *PCR*: ژن مربوط به پروتئین کامل core+1 ویروس HCV از ناحیه ۱۶۲-۱ و آنزیم‌های مورد استفاده *NheI* و *BamHI* انتخاب شدند. یک جفت آغازگر (Primer) حاوی توالی برش آنزیم‌های *NheI* و *BamHI* (قسمت‌های زیر خط شده در ابتدای '5 در توالی زیر)، کدون‌های شروع و ختم ترجمه، توالی Kozak (قسمت پر رنگ شده در توالی رو به جلو F) و برچسب هیستیدینی (6x Histag) قبل از کدون پایانی، برای کپی‌برداری از این ژن طراحی گردید.



شکل۱: نمایش مراحل ساخت پلاسمید pcDNA3.1(+) حاوی ژن core+1. K/ATG و TAA به ترتیب نشانه کدون شروع، توالی Kozak و کدون ختم ترجمه هستند.

F-NC: 5'-TAAG**GCTAGC**TA**CCATG**GGCACGATTCC-3'

R-NC: 5'-CTTTGTTAGCAGCCGGATCCACTAGTAAC-3'

این ژن از روی ژن اصلی که مربوط به ژنوتیپ 1b ویروس در تحقیقات گذشته ما مورد استفاده قرار گرفته بود (۱۴)، کپی برداری و در سکانس‌های برشی *NheI-BamHI* با انتهای چسبنده در پلاسمید یوکاریوتی pCDNA3.1(+) (Invitrogen, USA) کلون گردید (شکل ۱). PCR با استفاده از ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf, Hamburg, Germany) با مرحله سرنگ سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۴ °C، ۵۵ °C و ۷۲ °C هر یک به مدت یک دقیقه) ادامه یافته و در نهایت زمان ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. پس از انجام عمل PCR بر روی ژن core+1 مقدار ۲µl از محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

ب) تراریختی باکتری *E. coli* با *DNA* پلاسمیدی: به‌منظور ساخت ناقل نوترکیب مقادیر ۹۰ نانوگرم محصول حاصل از PCR ژن core+1 و ۳۶/۶ نانوگرم ناقل خطی شده به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA ligase (Fermentas, Lithuania)، ۱/۵ میکرولیتر بافر و ۶/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر با هم مخلوط شدند، سپس مخلوط حاوی DNA پلاسمیدی جهت تکثیر و غربالگری به باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α ترانسفورم شد. بعد از تکثیر و استخراج جهت تائید حضور قطعه و پلاسمید، تجزیه آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده NheI و BamHI صورت گرفت (۱۵ و ۱۶). به منظور استخراج پلاسمید از کیت extraction (Roche, Germany) Mini prep استفاده شد. برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید استخراج شده با استفاده از پرایمر یونیورسال BGH reverse که توالی آن بر روی ناقل pcDNA3.1(+) موجود بود به روش خودکار توسط شرکت seqlab آلمان تعیین توالی گردید.

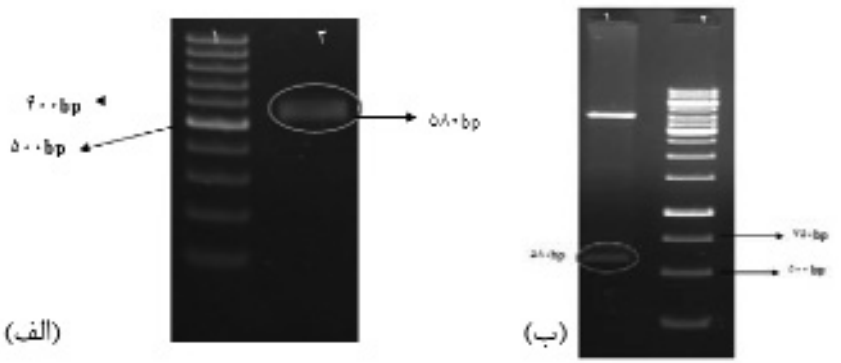
ج) وارد کردن پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *core+1* به سلول *Huh-7*: کشت و نگهداری رده سلولی Huh-7، در محیط کشت DMEM (Biosera) حاوی ۲ میلی‌مولار ال ـ گلوتامیل (Biosera)، ۱۰۰ واحد در

میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Biosera)، ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Biosera) و ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (Invitrogen, USA)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵ درصد CO_2 صورت گرفت. در این مطالعه سلول ها به دو روش لیپوفکشن و الکتروپوریشن به صورت موقت (Transient) با پلاسمید طراحی شده ترانسفکت شدند. برای این منظور سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند توسط تریپسین جدا شده و پس از جمع آوری و سانتریفیوژ (۵۰۰×g، ۵ دقیقه) دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) شسته شدند. در مرحله بعد تعداد $۱/۵\times۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر با ۱۰میکروگرم پلاسمید در بافر الکتروپوریشن (۲۰۰ میکرولیتر محیط DMEM حاوی HEPES(Sigma, USA) ۱۰ میلی مولار) مخلوط شده و به داخل cuvet (با عرض ۲ میلی متر) انتقال داده شدند. سپس کووت داخل دستگاه الکتروپوریشن (Gene pulser xcell, Biorad) قرار داده شد و سلول‌ها دو بار با فاصله زمانی ۴۰ میلی ثانیه تحت تاثیر ولتاژ ۱۴۰ قرار گرفتند (۱۷ و ۱۸). در روش لیپوفکشن از کیت jetPEITM-HUVEC (Polyplus-transfection, France) استفاده شد و ترکیب ترانسفکتشن طبق دستورالعمل کیت تهیه و در فاز لگاریتمی به کشت سلول اضافه شد. ۴۸ ساعت بعد سلول‌ها برای بیان پروتئین مورد نظر توسط فلوسایتومتری (FACS) و میکروسکوپ ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند.

د) فلوسایتومتری: به منظور تائید ورود پلاسمید نوترکیب به سلول‌ها، پلاسمید pEGFP-N1 (Invitrogen, USA) که حاوی ژن بیان‌کننده Green Fluorescent Protein (GFP) بود به همراه پلاسمید نوترکیب به نسبت ۱ به ۵ به صورت هم زمان به داخل سلول ترانسفکت شدند. میزان بیان GFP در این سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Partec Gmbh, Germany) بررسی شد. هم زمان سلول‌ها شمارش و درصد سلول‌های زنده مشخص شدند. سلول‌هایی که دارای درصد قابل قبولی از ترانسفکشن (بالاتر از ۱۵ درصد) بودند برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

ه) میکروسکوپ هم کانون: سلول‌های تراریخت شده در لام‌های مخصوص شیشه‌ای، در مجاورت پارافرم آلدهید ۴ درصد، به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای اتاق تثبیت شدند. به منظور کاستن از فلورسانس زمینه، پس از شستشو با PBS، لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول کلرور آمونیوم قرار گرفته و دوباره شستشو شدند. در ادامه سلول‌ها توسط محلول ۰/۱ درصد تریتون X-100 نفوذپذیر شده و پس از شستشو، به مدت ۱ ساعت در مجاورت آنتی‌بادی اولیه و سپس آنتی‌بادی کونژوگه با Fluorescein Isothiocyanate (FITC) در دمای اتاق انکوبه شدند. قبل و بعد از افزودن هر آنتی‌بادی سلول‌ها توسط PBS شسته شدند و در نهایت میزان فلورسانس سلول‌ها توسط میکروسکوپ کونفوکال (Zeiss ,USA) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه هسته با رنگ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) و پروتئین core+1 با آنتی‌بادی ضد His tag کونژوگه شده با FITC رنگ شدند.

و) بررسی های بیوانفورماتیک: در این تحقیق از نرم‌افزار 3.05



شکل۲: (الف) الکتروفور محصول PCR در ژل آگارز. ستون ۱ نشان گر DNA(1kb) وستون ۲ محصول ۵۸۰bP، (ب) تائید حضور و صحت قرارگیری قطعه ژن توسط هضم آنزیمی. ستون ۱ نشان گر DNA (1kb) ستون ۲ قطعه ۵۸۰bp حاصل از برش با آنزیم های NheI، BamHI.

Gene runner version و DNASIS MAX به‌منظور طراحی پرایمرها و Bio Edit version 7.0.4 و ClustalX برای بررسی نتایج تعیین توالی استفاده شدند. هم‌چنین با استفاده از نرم‌افزار clustalX، MEGA 4.0 و Gene Doc هم‌ردیفی توالی پروتئین core+1 در ژنوتیپ‌های مختلف HCV بررسی شد.

یافته‌ها

الف) تکثیر ژن *core+1* و تایید الحاق: نتیجه حاصل از الکتروفورز نشان دهنده تکثیر ژن core+1 با اندازه ۵۸۰bp بود (شکل ۲ الف).

به منظور تائید الحاق بین قطعه مورد نظر و وکتور، و با توجه به طرح پلاسمید و محل‌های شناسائی آنزیم‌های محدود کننده، با هضم هم زمان این پلاسمید توسط آنزیم های *NheI* و *BamHI* یک قطعه با انداه های ۵۸۰ جفت باز ایجاد شد (شکل۲ ب).

ب) تائیدسازه طراحی شده با استفاده از تعیین توالی: نتایج حاصل تعیین توالی نشان دادکه‌کاست بیانی به همراه پروموتور *Cytomegalovirus*(CMV)، محل اتصال ریبوزوم، کدون آغازی ATG، قطعه ژن core+1، برچسب هیستدینی و توالی پایانی، در ترادف مناسب و به صورت پشت سرهم قرار گرفته‌اند (شکل۳).

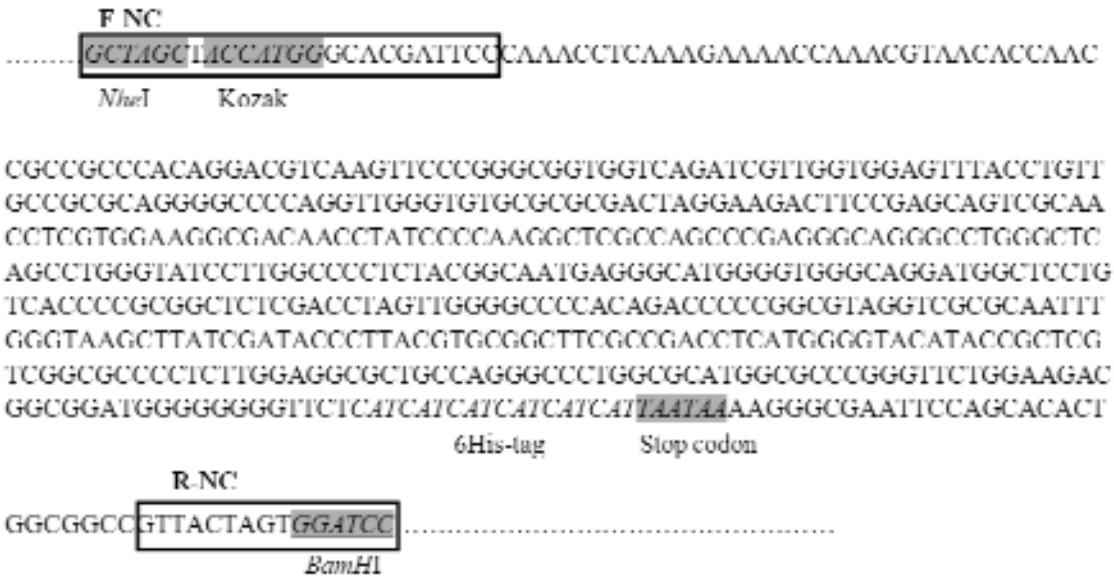
ج) بررسی نتایج سلول *Huh-7* تاریخت شده با فلوسایتومتری: میزان بیان پروتئین GFP در سلول Huh7 در سلول‌های ترانسفکت شده با تکنیک الکتروپوریشن و کیت jetPEITM-HUVEC در مقایسه با سلول ترانسفکت نشده حاکی از ورود پلاسمید نوترکیب به داخل سلول بود. نتایج نشان می‌دهد سلول‌های ترانسفکت شده با الکترو پوریشن نسبت به سلول‌هایی که با کیت jetPEITM-HUVEC ترانسفکت شده‌اند پروتئین GFP را بیشتر بیان می‌کنند (شکل۴).

د) بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ هم کانون: بررسی‌های انجام شده با استفاده از Anti-His (FITC) و میکروسکوپ هم کانون (کونفوکال) نشان داد که پروتئین core+1 به میزان قابل توجهی در سطح سیتوپلاسم و اندکی در هسته بیان می‌شود (شکل ۱-۵).

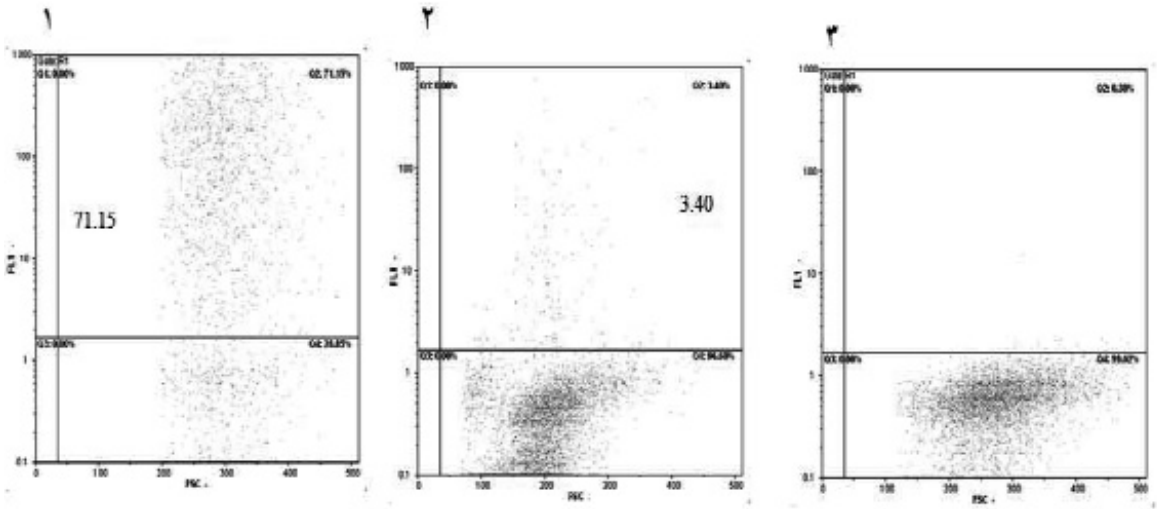
ه) هم ردیفی توالی آمینواسیدی پروتئین *Core+1*: نتایج موجود در شکل (۶) میزان تشابه توالی آمینواسیدی را در بین ژنوتیپ‌های مختلف HCV نشان می‌دهد.

بحث

عفونت‌های ویروسی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری هپاتیت در مقایسه با سایر عوامل ایجادکننده این بیماری هستند. حدود ۹۰ درصد از هپاتیت‌های non-A و non-B را ویروس هپاتیت C ایجاد می کند. هپاتیت C عامل اصلی بیماری حاد و مزمن کبدی شامل سیروز و سرطان کبد می‌باشد (۱ و ۳). پروتئین F ویروس



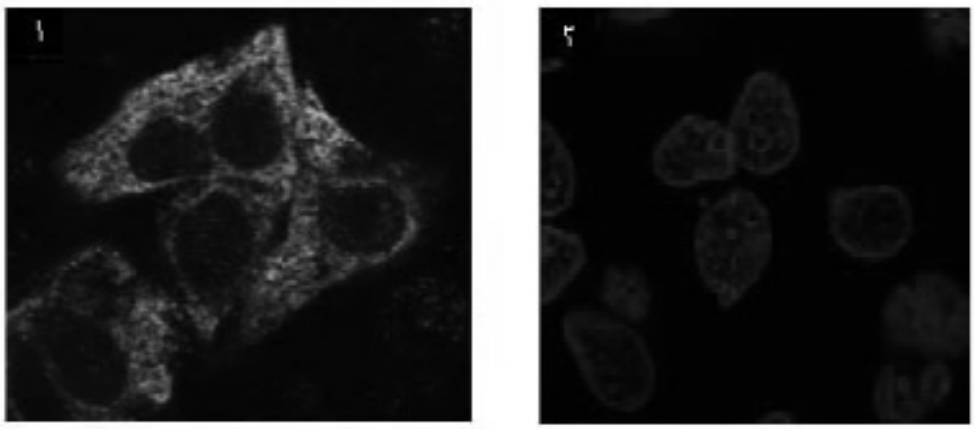
شکل۳: نتایج تعیین توالی. ترادف (1-161aa) core+1 در پلاسمید pcDNA3.1(+) و تایید صحت کاست بیانی.



شکل۴: بررسی ترانسفکشن سلول‌ها با فلوسایتومتری، (۱): سلول‌های ترانسفکت شده با الکتروپوریشن، (۲): سلول‌های ترانسفکت شده با jetPEITM-HUVEC، (۳): سلول‌های ترانسفکت نشده (کنترل منفی) (نقاط آبی بالای خط صفر نشان دهنده سلول‌های ترانسفکت شده می‌باشد).

هپاتیت C یک پروتئین ۱۷ کیلودالتونی است که در طول عفونت طبیعی توسط برخی از ریز تایپ های ویروس هپاتیت C تولید شده و پاسخ‌های ایمنی اختصاصی (به خصوص ایمنی هومورال) را تحریک می‌کند (۴). این پروتئین به دنبال Ribosomal frameshift+1 بین کدون ۸ تا ۱۱ از ناحیه کد کننده core در ژنوتیپ 1a، و کدون ۴۲ در ژنوتیپ 1b ساخته می‌شود (۷ و ۸). این پروتئین در حدود ۴۱ الی ۸۹ درصد از افراد آلوده به این ویروس بیان می‌شود (۵). از آن جایی که نقش این پروتئین در بیماری‌زایی ویروس در میزبان کاملا شناخته نشده است، در این مطالعه سازه‌ای طراحی شد تا بتواند پروتئین core+1 را در سلول‌های یوکاریوتی بیان کند تا در مطالعات بعدی بتوان از این سازه برای بررسی نقش این پروتئین در بیماری زایی، پاسخ ایمونولوژیک علیه این ویروس و مسیر سیگنالینگ سلولی استفاده کرد.

در مطالعه حاضر ژن core+1 ویروس هپاتیت C در ناقل یوکاریوتی کلون و بیان شد. از دو روش الکتروپوریشن و کیت تجاری jetPEITM-HUVEC به منظور ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب به سلول یوکاریوتی (Huh7) استفاده شد. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد، بیان پروتئین GFP در سلول‌هایی که با الکتروپوریشن ترانسفکت شدند به میزان قابل توجهی بیشتر از سلول‌هایی است که با کیت jetPEITM-HUVEC ترانسفکت



شکل۵: بررسی سلول Huh-7 توسط میکروسکوپ هم کانون (کونفوکال). (۱) سلول‌هایی که با آنتی بادی موشی ضد His tag و آنتی‌بادی ضدموشی متصل به FITC رنگ شده (نقاط روشن)، (۲)سلول‌هایی که با DAPI رنگ شده (مناطق تیره).

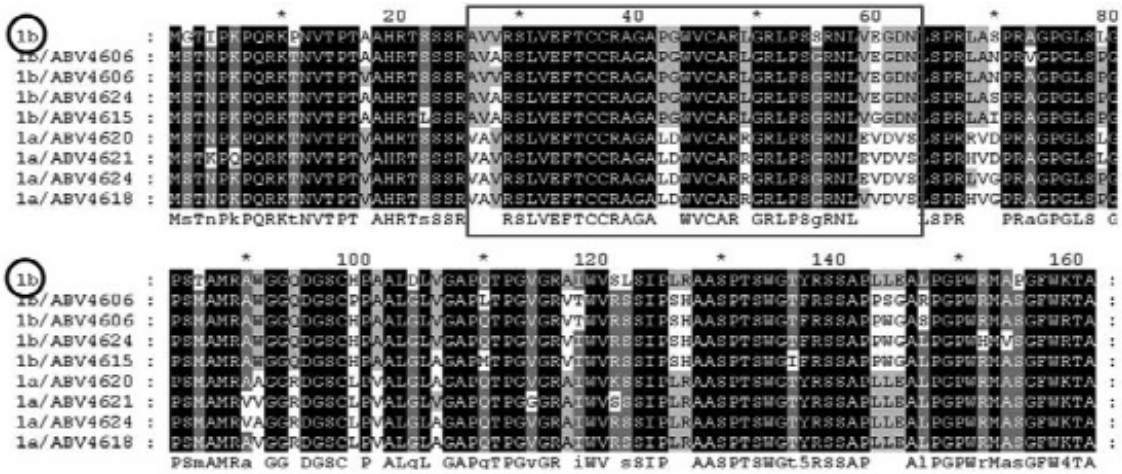
شده‌اند، از آن جایی که الکتروپوریشن روش ارزان تر و ساده‌تری است پس می‌توان نتیجه گرفت الکتروپوریشن تکنیک مناسبی در ترانسفکشن پلاسمید نوترکیب pcDNA3.1(+)-core+1 به سلول Huh7 می‌باشد.

به علاوه نتایج حاصل از میکروسکوپ کونفوکال نشان می‌دهد که کاست بیانی طراحی شده قادر است در سلول Huh7 بیان شود، که این خود می‌تواند تائیدی بر صحت سازه طراحی شده باشد.

در مطالعه ای که توسط Xu و همکارانش انجام شده نشان داده شد که پروتئین core+1 مربوط به ژنوتیپ 1a دارای دو بخش آب گریز اصلی در بین آمینواسیدهای ۲۸ تا ۴۵ و ۹۵ تا ۱۱۰ می‌باشد. این نواحی نشان می‌دهد که پروتئین F می‌تواند با غشای شبکه اندوپلاسمی برهم کنش داشته باشد (۵ و ۱۹). این بخش به احتمال زیاد دارای ساختار مارپیچ آلفا می‌باشند، که بیانگر وجود نواحی درون غشایی فرضی در داخل این پروتئین است. این نواحی می‌تواند منجر به نامحلول شدن این پروتئین و تجمع آن در شبکه اندوپلاسمی شود (۱۸)، در نتیجه تعدادی از اپی توپ‌های این پروتئین و هم‌چنین آنتی‌بادی‌های ضد آن از دست می‌رود. Mei-ling و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که پروتئین F با پروتئین سلولی به‌نام PFD2 برهم‌کنش می‌کند، این پروتئین در سازماندهی اسکلت سلولی و تشکیل میکروتوبول ها نقش مهمی را برعهده دارد. برهم‌کنش این پروتئین با PFD2 در سازماندهی اسکلت سلولی اختلال ایجاد می‌کند، که می‌تواند در مقاومت ویروسی و ایجاد عفونت مزمن نقش داشته باشد (۱۹). پروتئین کامل core+1 از ویروس هپاتیت C که در اثر تغییر چارچوب ریبوزومی در کدون‌های ۹ تا ۱۱ ساخته می‌شود، پروتئین ناپایداری است که توسط پروتئازوم تجزیه می‌شود. core+1 حاوی بخشی است که می‌تواند به زیر واحد ۳± پروتئازوم متصل شود که این می‌تواند دلیلی بر ناپایداری این پروتئین باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند این بخش بین آمینواسیدهای ۴۰ تا ۶۰ قرار دارد، اما به تنهایی نمی‌تواند منجر به ناپایداری این پروتئین شود، توالی که در بالادست این بخش بین توالی آمینواسیدی ۲۰ تا۴۰ وجود دارد می‌تواند در تجزیه این پروتئین توسط پروتئازوم نقش داشته باشد. شکل‌های ARFP/S و ARFP/DF که فاقد این بخش‌ها هستند پروتئین‌های پایداری می‌باشند (۱۹).

از آن جایی که پروتئین ساخته شده در این تحقیق شکل کامل پروتئین F می‌باشد (۱۶۱-۱) و با توجه به نتایج هم ردیفی و تشابه توالی آمینواسیدی (نواحی ۲۰ تا ۴۰) می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین ساخته شده در این تحقیق نیز می‌تواند ناپایدار باشد و توسط پروتئازوم تجزیه شود که می‌تواند در بیان، تشخیص و عملکرد این پروتئین تاثیر بگذارد از این رو بررسی‌های بیشتر در این زمینه در حال انجام است.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد پروتئین F (۱۶۱-۱) حاصل از



شکل۶: مقایسه هم ردیفی توالی پروتئین core+1 در ژنوتیپ‌های مختلف HCV. نواحی تیره و روشن به ترتیب تشابه و تفاوت توالی آمینواسیدی را نشان می‌دهد (ناحیه مشخص شده در شکل توالی پروتئین core+1 مورد استفاده را نشان می‌دهد).

ژنوتیپ 1a در سیتوپلاسم و هسته و پروتئین ARFP/S (86-161) در سیتوپلاسم، شبکه اندوپلاسمی و اطراف هسته استقرار می‌یابد. در مورد ARFP/DF حاصل از ژنوتیپ 1b بررسی‌ها نشان می‌دهد که موقعیت برچسب اتصالی (GFP) در محل تجمع آن تاثیر می‌گذارد، به طوری که اگر GFP در پایانه N قرار داشته باشد در هسته و سیتوپلاسم و زمانی که GFP در پایانه C باشد در هسته جای می‌گیرد (۱۳). نتایج حاصل از این تحقیق برای اولین بار نشان می‌دهد که با توجه به محل استقرار His tag در انتهای پروتئین ARFP/F مربوط به ژنوتیپ 1b، این پروتئین در سیتوپلاسم و تا حدی در هسته جای می‌گیرد.

در این مطالعه سلول‌ها هم با الکتروپوریشن و هم با کیت تراریخت شدند، نتایج فلوسایتومتری حاکی از بیان بیشتر سلول‌های تراریخت شده به روش الکتروپوریشن در مقایسه با روش کیت است. این موضوع برتری روش الکتروپوریشن را نسبت به روش کیت نشان می‌دهد (شکل ۴).

از آن جایی که توالی آمینواسیدی پروتئین core+1 مورد مطالعه با پروتئین ساخته شده توسط ژنوتیپ 1a و سایر ژنوتیپ ها تشابه دارد لذا می‌بایست مطالعات بیشتری بر روی غشایی بودن این پروتئین به ویژه در ناحیه ER صورت بگیرد. هم‌چنین برای اولین‌بار نشان داده شد که پروتئین core+1 مربوط به ژنوتیپ 1b در سیتوپلاسم و هسته استقرار می‌یابد. با توجه به محل استقرار این پروتئین و مطالعات انجام شده، احتمال دارد که این پروتئین بتواند با پروتئین‌های سیتوزولی و هسته‌ای برهم‌کنش داشته باشد که در تکثیر و پایداری ویروس در سلول و سرنوشت بیماری تاثیر دارد.

نتیجه گیری

از آن جایی که نقش پروتئین core+1 در بیماری‌زایی، پاسخ ایمونولوژیک و مقاومت به درمان بیماری هپاتیت C کاملا شناخته نشده است، تحقیق حاضر می‌تواند مقدمه‌ای برای تحقیقات بعدی در زمینه شناخت بیشتر نقش و عمل‌کرد این پروتئین باشد. به دنبال این مطالعه و اطمینان از عمل کرد این سازه، بررسی نقش این پروتئین در مسیر سیگنالینگ، مقاومت به درمان و برهم‌کنش با پروتئین‌های موجود در هسته و سیتوپلاسم با هدف به دست آوردن روشی برای درمان و ساخت واکسن علیه این ویروس در بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور ایران در حال انجام است.

تقدیر و تشکر

بخش‌هایی از هزینه‌های این تحقیق با امتیاز ACIP-AP20-2010 انستیتوپاستور ایران تامین شده است.

References

1. Demetrious VL, Vijver D, Kostrikis G. Molecular epidemiology of Hepatitis C Infectiom in Cyprus: Evidence of polyphyletic infection. J Med Virol. 2009;(4): 238-248.
2. Chevaliez S, Pawlotasky JM. Hepatitis C Virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. Int J Med Sci. 2006; 3(2): 35-40.
3. Brass V, Moradpour D, Blum HE., Molecular virology of hepatitis C virus (HCV). Int J Med. 2006;3(2), 29-34.
4. Guidotti, L. G. and Chisari, F. V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. Annu. Rev. Pathol. 2006; (1): 23-61.
5. Roingeard P, Hourioux C. Hepatitis C virus core protein, lipid droplet and steatosis. J Viral Hepatitis. 2008; (15): 157-164.
6. Branch, A. D., Stump, D. D., Gutierrez, J. A., Eng, F. and Walewski, J. L. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. Liver Dis. 2005;(25): 105-117
7. Vassilaki N, Mavromara P. Two alternative translation mechanisms are responsible for the expression of the HCV ARFP/F/Core+1 coding open reading frame. JBC. 2003;(4):03-13.
8. Boulant S, Bwchi M, Penin F, and Lavergne JP. Unusual multiple recoding event leading to alternative form of Hepatitis C virus core protein frome genotype 1b. JBC. 2003;278(4):45785-45792.
9. Brail M, Brakier GL. 2005. Translation of the F protein of hepatitis C virus is initiated at non-AUG codon in a 11 reading frame relative to the polyprotein. Nucleic Acid Res. 2005;(5): 74-86.

10. Basu A, Steele R, Ray R, Ray RB. Functional properties of 16 KDa protein translated from an alternative open reading frame protein of core-encoding genomic region of hepatitis C virus. J Gen virol. 2004;(8): 2299-2306.
11. Branch AD, Walewaski JL, Gutierrez JA. HCV alternative reading frame protein (ARFP) may be virulence factor that help the virus survive adverse conditions. Hepatol.2003;(3): 468A-479A.
12. Branch AD, Walwaski JA, et al. HCV alternative reading frame proteins (ARFP) may be virulence factors that help the virus surive adverse conditions. Hepatol. 2003;(8): 8A-9A.
13. Ratinier M, Boulant S, Crussard S, Maclauchlan J, Lavergne JP. Subcellular localization of the hepatitis C virus alternative reading frame proteins. Virus Res. 2009;(9): 106-110.
14. Roohvand F, Aghasadeghi MR, Sadat SM, Budkowaska A, Khabiri AR. HCV core protein immunization with Montanide/CpG elicits strong Th1/Th2 and long-lived CTL response. BBRC. 2007;(4): 641-649.
15. Canatella PJ, Prausnitz MR. Prediction and optimization of gene transfection and drug delivery by electroporation. Naure Publishing Group. 2001;(8): 64-69.
16. Chinnaswamy, S., Yarbrough, I., Palaninathan, S., Kumar, C. T., Vijayaraghavan, V., Demeler, B., Lemon, S. M., Sacchettini, J. C. and Kao, C. C. A locking mechanism regulates RNA synthesis and host protein interaction by the hepatitis C virus polymerase. J. Biol. Chem. 2008;(2): 20535-20546.
17. Mei LT, Chug HC, Chau TY. Interaction of hepatitis C virus F protein with perfoldin 2 perturb tubulin cytoskeleton organization. Biochem Biophys Res Commun. 2006;(1): 271-277.
18. Chang, K. S., Jiang, J., Cai, Z. and Luo, G. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. J. Virol. 2007;(1) : 13783-13793.
19. Xu Z, Choi J, Lu W, Ou JH. Hepatitis C virus F protein is short -live protein associated with the endoplasmic reticulum. J Viro. 2003 (2): 1578-1583.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 4, February 2010

A confocal-microscopic study on HCV core+1 protein expression

Hassan Noorbazargan[1], Atieh Hashemi[2], Fatemeh Motavali[3], Mohamadreza Aghasadeghi[4], Arash Memarnejadian[4], Mahdi Assmar[5], Farzin Roohvand[6]

[1]M.Sc., Department of microbiology, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran

[2]Ph.D Student, Department Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[3]M.Sc., NRGB, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[4]Assisstant Professor, Department Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

[5]Professor, Department of microbiology, Islamic Azad University, Lahijan Branch, Lahijan, Iran

[6]Assisstant Professor, NRGB, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Core+1 or F protein is recently identified to be encoded by hepatitis C virus (HCV) genome. Although functional properties of this protein are not still discovered, core+1 seems to play important roles in viral life cycle and pathogenesis. This study seeks to clone and express HCV core+1 gene in a eukaryotic system with the final aim of evaluating its potential roles in cell signaling pathways and resistance of HCV to therapy.

Material and Methods: Core+1 gene corresponding to the amino acids 1-162 was PCR-amplified from the original gene of subtype b that was previously cloned in a prokaryotic vector (14). The amplicon harboring 6xHis-tag at C-terminal was subsequently subcloned in the eukaryotic pCDNA3.1+ vector. The Nhe I / BamHI restriction sites, initiation and stop codons as well as kozak sequences were designed in the primers. Constructed plasmid was verified by restriction enzyme analysis and sequencing reactions. Liver cell line of Huh7 was transfected with this plasmid using electroporation and lipofection techniques. Transfection efficiency was checked by co-transfection of pEGFPN1 plasmid and flowcytometry. Finally expression and localization of core+1 protein was evaluated by means of confocal microscopic technique.

Results: Restriction enzyme analysis and sequencing reactions indicated the accuracy of cloning procedure. Flow cytometric analysis showed higher electroporation efficiency for transfection of Huh7 cells, in comparison with lipofection method. Finally, results of confocal microscopic microscopy using anti-His antibody confirmed the transcription and expression of core+1 protein in Huh7 cells.

Conclusions: Our study resulted in the eukaryotic expression of core+1 protein in Huh7 cells and provided an appropriate tool for future studies on the potential interference of core+1 with intracellular signaling pathways and cellular protein interaction.

Keywords: Hepatitis C Virus, core+1 protein, Huh7 cell.

Correspondence to: Dr. Farzin Roohvand
E-mail: rfarzin@pasteur.ac.ir and
farzin.roohvand@gmail.com
Tel: 021-66969291 Fax: 021-66969291
Journal of Microbial World 2010, 2(4) - 217-226