جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی جلوگیری از توقف سنتز پروتئین و مرگ سلول میزبان بوسیله یک ژن هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک بنام ICP34.5 در یک کشت سلولی با منشاء عصبی بنام SK-N-SH

دکتر علی کریمی*، دکتر محمدرضا نفیسی**، دکتر حسن تمیزی فر***

چکیده:

زمینه و هدف: پاسخ سلولی به عفونت ویروسی یک واکنش پیچیده‌ای است که شامل القاء اینترفرون می باشد. اینترفرون‌ها اجزاء مهم و کلیدی پاسخ‌های ایمنی طبیعی میزبان به عفونت ویروسی بوده و از طریق چندین مکانیزم تکثیر ویروس در سلول و در نتیجه ویرولانس آن را مهار می کند. در سلول های آلوده با ویروسهای مختلف، RNA دو رشته‌ای سنتز می‌شود که القاء کننده اینترفرون است. آنزیم پروتئین کیناز R (PKR) بوسیله اینترفرون القاء شده و یک واسطه مهم و عمده پاسخ سلولی به عفونت ویروسی است. فعالیت این آنزیم منجر به فسفوریله شدن جزء آلفا فاکتور آغاز گر (eIF2-α) و در نتیجه توقف سنتز پروتئین در سلول می‌گردد. در سلول آلوده با هرپس سیمپلکس ویروس نوع یک (HSV-1)، نیز این عمل منجر به توقف زودرس سنتز پروتئین سلول میزبان می شود ولیکن این ویروس دارای ژنی بنام ICP34.5 است که مانع این عمل در سلول آلوده با این ویروس می گردد. این ژن عامل تکثیر و ویرولانس HSV-1 در سیستم عصبی مرکزی (CNS) نیز بوده ولیکن برای تکثیر ویروس در تعدادی از کشت های سلولی ضروری نیست، نقش این ژن در کشت سلولی با منشاء عصبی بنام SK-N-SH آلوده با موتانت های نوترکیبی از HSV-1 که اختصاصاً ژن مذکور را بیان کند، بررسی نشده است. لذا هدف از این تحقیق، بررسی این نقش بوده است.

روش مطالعه: بر اساس خاصیت نوترکیبی ژنتیکی، یک موتانت نو ترکیب از ویروس فوق الذکر ساخته شد، درستی اسیدنوکئیک آن با روش ساترن بلاتینگ تایید و سپس با روشهای وسترن بلاتینگ و جلوگیری از توقف سنتز پروتئین، خصوصیات آن بررسی گردید.

نتایج: جلوگیری از توقف سنتز پروتئین بوسیله موتانت نوترکیب مذکور در مقایسه با یک موتانت حذفی فاقد این ژن و نیز یک سویه وحشی از HSV-1 بنام (+17) در کشت سلولی SK-N-SH نشان داد که ژن مذکور برای حفظ سنتز پروتئین و در نتیجه تکثیر HSV-1 در این کشت سلولی ضروری می با شد.

نتیجه گیری: احتمالاً این ژن مسئول جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در سلول های فوق الذکر پس از عفونت با HSV-1 می با شد.

واژه‌های کلیدی: HSV، توقف سنتز پروتئین، هرپس سیمپلکس ویروس.

مقدمه:

پاسخ سلولی به عفونت ویروسی به صورت واکنش های پیچیده‌ای است که القاء اینترفرون جزیی از آن محسوب می گردد. اینترفرون ها از اجزا اصلی و مهم پاسخ ایمنی میزبان به عفونت ویروسی بوده و از طریق

*استادیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد: رحمتیه - دانشکده پزشکی - گروه میکروب - تلفن: ۳۳۳۵۶۵۴-۰۳۸۱، (مؤلف مسئول).
**استادیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.
*** استادیار گروه میکروبیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چندین مکانیسم تکثیر و در نتیجه ویرولانس ویروس را مهار می‌کنند (۱۷). عفونت ویروسی در سلول منجر به سنتز RNA دو رشته‌ای شده که این عمل نیز باعث القا سنتز اینترفرون درسلول می گردد (۱۱). سنتز اینترفرون منجر به سنتز PKR در سلول می گردد که واسطه مهم و عمده پاسخ سلولی به عفونت ویروسی است. این آنزیم از طریق اتوفسفوریلاسیون و دیمریزا سیون فعال گردیده (۱۸،۱۶) و باعث فسفوریله شدن eIf-2α می‌شود. فسفوریله شدن این فاکتور منجر به توقف (Shut-off) شدن سنتز پروتئین سلول میزبان (مرگ سلولی) و در نتیجه مانع تکثیر ویروس در آن می گردد (۱۳،۱۰).

عفونت ویروس HSV-1 نیز با همان مکانیزم منجر به توقف زودرس سنتز پروتئین سلول میزبان می‌گردد، ولیکن HSV-1 با کد کردن ژنی بنام ICP34.5 از آن جلوگیری می‌نماید (۳). به دنبال عفونت سلول با این ویروس، PKR فعال شده و eIf-2α را فسفریله می نماید ولیکن در این سلول ها پروتئین ICP34.5 با یک آنزیم بنام پروتئین فسفاتاز یک (PP1α) تشکیل یک کمپلکس داده وآنزیم اخیر eIf-2α را دی فسفوریله کرده (۹،۸) و در نتیجه مانع توقف زود رس سنتز پروتئین سلول میزبان می‌گردد (۵). در موتانت‌های حذفی فاقد ژن ICP34.5، PKR فعال شده، eIf-2α فسفوریله شده و در نتیجه سنتز پروتئین در سلول متوقف می‌گردد (۶).

موتانت‌های حذفی فاقد ژن ICP34.5 در کشت سلولی کلیه نوزاد هامستر(BHK) بطور نرمال در مقایسه با ویروس وحشی تکثیر کرده و سنتز پروتئین در این سلول ها ادامه می‌یابد ولیکن تکثیر این موتانت در کشت سلولی فیبرو بلاست جنین موش (3T6) بسیار محدود است (۴،۲،۱). سنتز پروتئین در کشت سلول با منشاء عصبی SK-N-SH با موتانت‌های نوترکیب که بیان کننده ژن ICP34.5 باشند تاکنون بررسی نگردیده است. در این بررسی سنتز پروتئین در سه نوع کشت سلول پس از عفونت با دو نوع موتانت در مقایسه با سویه وحشی بررسی گردید. از آنجایی که ژن ICP34.5 عامل ویرولانس HSV-1 در سیستم عصبی مرکزی موش است (۱۴،۱۲،۶). بررسی نقش این ژن در ممانعت از توقف سنتز پروتئین در سلول های عصبی که شاید در ارتباط با ویرولانس این ویروس باشد دارای اهمیت می باشد.

مواد و روشها:

مواد:

سلول: Baby Hamster Kidney (BHK) کلون ۱۳، نوروبلاستومای انسانی (SK-N-SH) و فیبروبلاست جنین موش (3T6)، سلول‌های مذکور از شرکت Life technolog تهیه شده است.

ویروس: سویه های ویروسی بکار برده شده عبارتند از: سویه وحشی از هرپس سیمپلکس نوع یک بنام (+17)، موتانت حذفی آن ویروس 1716 که ژن ICP34.5 در آن حذف گردیده است (۱۲) ویروس 1622 موتانت نو ترکیب که بر پایه (1716) ساخته شده و فقط ژن ICP34.5 را بیان می کند.

روش:

کشت سلول: سلول‌های BHK, 3T6 و SK-N-SH در محیط کشت (Eagls) در حرارت ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد و پس از آن با ویروس های مختلف آلوده گردید. محیط های کشت نیز از شرکت Life technology تهیه شده است.

نوترکیبی ژنتیکی: در این روش از متد بکار برده شده بوسیله MacLean et al (1991) استفاده شد (۱۲).

توقف سنتز پروتئین (Host shut off): در این روش عفونت با سویه های ویروسی به میزان (20 pfu/cell) در

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کشت‌های سلولی ایجاد شد و به علاوه یک کشت سلولی فاقد عفونت با ویروس به عنوان کنترل منفی عفونت (Mock infection) بکار رفت. پس از ایجاد عفونت، سلول ها به مدت ۱۴ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شده، سپس به آنها اسید آمینه نشاندار متیونین اضافه گردید و دو ساعت بعد سلول های مذکور با بافر شسته شده و سپس پروتئین های سلولی استخراج و بوسیله SDS-PAGE مورد آنالیز قرار گرفت.

Southern blotting: در این روش از متد بکار برده شده بوسیله MacLean et al استفاده شد (۱۲).

Western blotting: در این روش از متد بکار برده شده بوسیله McKay et al استفاده شد (۱۵).

تصویر شماره ۱: ساختمان سویه های (+17)، (1716) و (1622)

الف) این شکل ساختمان (+17) را نشان می دهد. "a" نشاندهنده سکانس های تکراری موجود در دو انتهای ژنوم و " 'a" سکانس های تکراری معکوس نسبت به "a" بوده و "b"، " 'b"، "c" و " 'c" نیز سکانس های تکراری می باشند. ب) این شکل ساختمان (1716) را نشان می دهد که در آن علامت ضربدر نشان دهنده حذف ژن ICP34.5 می باشد.

ج) این شکل ساختمان (1622) را نشان می دهد که در آن موقعیت آنزیم های محدودالاثر را نشان داده که در این نقطه دو ژن ICP34.5 و LacZ جا سازی (Insert) شده اند.

نتایج:

ساختن ویروس های نو ترکیب:

تنها ویروس نوترکیب ساخته شده در این بررسی، (1622) است که بیان کننده ژن ICP34.5 است. به علاوه، این موتانت، ژن LacZ (بتا گالاکتوزیداز) را نیز به عنوان اندیکاتور جدا سازی ویروس از کشت سلول بیان می کند (تصویر شماره ۱، ج). ویروس مولد این موتانت، (1716) است که ژن ICP34.5 در آن حذف شده و از قبل در آزمایشگاه موجود بوده است (تصویر شماره ۱، ب). برای ساختن (1622)، کشت سلولی BHK با DNA.

تصویر شماره ۲: تست (Western blooting) بیان ژن ICP34.5 در موتانت های نوترکیب:

عفونت با ویروس های مورد نظر در کشت سلولی BHK به میزان (20pfu/cell) انجام گرفته و پس از ۲٤ ساعت، سلول های مذکور (Harvest) شده و با تلقیح پروتئین های بدست آمده به ژل SDS-PAGE، تست (Western blooting) با آنتی سرم اختصاصی ICP34.5

صورت گرفت. ستون ۱: (+17)، ستون۲: (1622)، ستون ۳: (1716)، ستون های ٤ و ٥: Mock infection. در سمت راست، مارکر وزن مولکولی پروتئین و در سمت چپ ICP34.5 نشان داده شده است.

ویروس والد (1716) و پلاسمید دارای ژن های ICP34.5 و LacZ به صورت عفونت همزمان (Cotransfection) آلوده گردید که در نتیجه انجام نوترکیبی ژنتیکی (Homologous recombination) بین قطعات مشابه دو ژنوم، موتانت نوترکیب (1622) ساخته شد و سپس با روش خالص سازی پلاک‌های ویروسی (Plaque purification) جدا سازی و خالص گردید. سویه (+17) از HSV-1 به عنوان سویه وحشی بکار رفت.

بیان ژن ICP34.5 بوسیله (1622):

پس از ساختن موتانت مذکور، با انجام تست Western blotting (تصویر شماره ۲) مشخص گردید که این موتانت (1622) (ستون ۲) در مقایسه با (+17) (ستون،۱) ژن مذکور را بیان می کند، در حالی که (1716) (ستون ۳) قادر به سنتز این پروتئین نیست.

تصویر شماره ۳: تست (Western blooting) بیان ژن ICP34.5 در موتانت های نوترکیب.

عفونت با ویروس های مورد نظر در کشت سلولی (BHK) به میزان (20pfu/cell) انجام گرفته و پس از ۲٤ ساعت، سلول های مذکور (Harvest) شده و با تلقیح پروتئین های بدست آمده به ژل SDS-PAGE، تست (Western blooting) با آنتی سرم اختصاصی

ICP34.5 صورت گرفت. ستون ۱: (+17)، ستون۲: (1622)، ستون ۳: (1716)، ستون های ٤ و ٥: Mock infection در سمت راست، مارکر وزن مولکولی پروتئین و در سمت چپ ICP34.5 نشان داده شده است.

جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در کشت های سلولی:

برای نشان دادن اینکه ژن ICP34.5 قادر به جلوگیری از توقف سنتز پروتئین سلولی بدنبال عفونت با HSV-1 در سلول های SK-N-SH می‌باشد، عفونت کشت‌های سلولیBHK، K-N-SH و 3T6 با سویه‌های (1622)، (1716) و (+17) به میزان (20 pfu/ml) انجام گرفت. پس از انکوباسیون به مدت ۱۴ ساعت متیوین نشاندار شده به کشت سلول اضافه شده و دو ساعت بعد پروتئین های سلولی استخراج گردیده و در ژل SDS-PSGE مورد آنالیز قرار گرفت. در تصویر شماره ۳، الف،کشت سلولی SK-N-SH (1622) در ستون‌های (۳و۵) قادر به جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در مقایسه با (+17) (ستون ۱) در سلول های مذکور بوده است و در سلول های آلوده با هر دو سویه، سنتز پروتئین ادامه یافته ولیکن در سلول های آلوده با (1716) (ستون های ۲،۴،۶). سنتز پروتئین متوقف گردیده است. (در تصویرهای شماره ۳ ب و ج)، کشت های سلولی BHK و 3T6، به ترتیب، همه سویه های ویروسی الگوی سنتز پروتئین یکسانی داشته و در هیچکدام از آنها سنتز پروتئین متوقف (Sutt-off) نشده است که نشان می دهد ژن مذکور برای جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در این کشت‌های سلولی ضروری نیست.

بحث:

ویروس والد بکار برده شده در این بررسی، (1716) است که در آن ژن ICP343.5 حذف گردیده و خصوصیات آن قبلاً بررسی گردیده است (۱۲). این بررسی ها نشان داده که این ژن عامل تکثیر و ویرولانس ویروس HSV-1 در CNS موش بوده به طوری که موتانت های فاقد این ژن بطور کامل در موش غیر بیماریزا هستند (۶،۱۲،۱۴). در (*in vitro*) ژن مذکور برای

جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در کشت های سلولی نظیر BHK و 3T6 ضروری نبوده (۱،۲،۴،۶،۷) که در این بررسی نیز این نتایج تایید گردید ولیکن در کشت‌های سلولی نظیر SK-N-SH ضروری می باشد (۸). نقش ژن ICP34.5 در پاتوژنز HSV-1 در سلول های عصبی، حفظ سنتز پروتئین سلولی و ویروسی در طی عفونت با ویروس مذکور است (۴،۵،۸) که احتمالاً با قدرت تکثیر ویروس در این سلول ها مرتبط می باشد.

عفونت سلول های مذکور با موتانت‌هایی نظیر (1716) منجر به فعال شدن PKR، فسفوریله شده eIf-2α و توقف زودرس سنتز پروتئین سلول میزبان می گردد (۵). بررسی های انجام شده در این زمینه با بکار بردن موتانت‌هایی نظیر(1716) بوده است (۱۲). در این بررسی از موتانت نوترکیب (1622) که ژن مذکور را بیان می کند استفاده شد و خاصیت جلوگیری از توقف سنتز پروتئین آن با (1716) و (+17) مقایسه گردید. نتایج نشان داد که برگشت دوباره (Restoration) ژن ICP34.5 در (1716) که منجر به ایجاد موتانت (1622) گردید، در مقایسه با (1716) و (+17) باعث حفظ سنتز پروتئین سلولی در کشت سلولی SK-N-SH می شود. با توجه به اینکه ژن ICP34.5 عامل ویرولانس ویروس HSV-1 در سیستم عصبی مرکزی انسان شناخته شده است (۶،۱۲،۱۴)، می توان نتیجه گرفت که ژن مذکور، احتمالاً از طریق جلوگیری از توقف سنتز پروتئین در سلول های عصبی آلوده با HSV-1 به تکثیر و در نتیجه ویرولانس این ویروس این سلول ها کمک می کند.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاران محترم گروه میکروبیولـوژی کـه در انجام این طرح ما را یاری کردند قدردانی می گردد

Reference:

1. Bolovan CA.; Sawtell NM.; Thompson RL. ICP34.5 mutants of *herpes simplex virus type 1* strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. J Viro, 68: 48-55, 1994.

2. Brown SM.; Harland J.; MacLean AR.; Podlech J.; et al. Cell type and cell state determine differential *in vitro* growth of non- neurovirulent ICP34.5-negative herpes simplex virus types 1 and 2. J Gen Viro, 75: 2367-77, 1994.

3. Chou J.; Roizman B. *Herpes simplex virus type 1* γ(1)34.5 gene function, which blocks the host response to infection, maps in the homologous domain of the genes expressed during growth arrest and DNA damage. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 5247-51, 1994.

4. Chou J.; Roizman B. The γ(1)34.5 gene of *herpes simplex virus type 1* precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programed cell death in neuronal cells. Proc Natl Acad Sci USA, 89: 3266-70, 1992.

5. Chou J.; Chen JJ.; Gross M.; Roizman B. Association of a M(r) 90,000 phosphoprotein with protein kinase PKR in cells exhibiting enhanced phosphorylation of translation initiation factor eIF-2 alpha and premature shutoff of protein synthesis after infection with γ(1)34.5- mutants of *herpes simplex virus type 1*. Proc Natl Acad Sci USA, 92, 10516-20, 1995.

6. Chou J.; Kern ER.; Whitley RJ.; Roizman B. Mapping of *herpes simplex virus-1* neurovirulence to γ(1)34.5, a gene nonessential for growth in culture. Science, 250: 1262-6, 1990.

7. Chou J.; Poon AP.; Johnson J.; Roizman B. Differential response of human cells to deletions and stop codons in the γ(1)34.5 gene of *herpes simplex virus*. J Virol, 68: 8304-11, 1994.

8. He B.; Gross M.; Roizman B. The γ(1)34.5 protein of *herpes simplex virus type 1* complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 843-8, 1997.

9. He B.; Gross M.; Roizman B. The γ(1)34.5 protein of *herpes simplex virus type 1* has the structural and functional attributes of a protein phosphatase 1 regulatory subunit and is present in a high molecular weight complex with the enzyme in infected cells. J Biol Chem, 273: 20737-43, 1998.

10. Katze MG. Games viruses play: a strategic initiative against the interferon-induced dsRNA activated 68,000 Mr protein kinase. Semin Virol, 4: 259-68, 1993.

11. Katze MG. Regulation of the interferon-induced PKR: can viruses cope? Trends Microbiol, 3: 75-8, 1995.

12. MacLean AR.; Ul-Fareed M.; Robertson L.; Harland J.; et al. *Herpes simplex virus type 1* deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. J Gen Virol, 72: 631-9, 1991.

13. Mathews MB. IFN induced mechanisms against viruses. In: Mathews JW.; Hershey N. Sonenberg translational control: From Cold Spring Harbor Labratory Proceedings. NewYork: USA, 505-48, 1996.

14. McKie EA.; Hope RG.; Brown SM.; MacLean AR. Characterization of the herpes simplex virus type 1 strain 17+ neurovirulence gene RL1 and its expression in a bacterial system. J Gen Virol, 75: 733-41, 1994.

15. McKay EM.; McVey B.; Marsden HS.; Brown SM.; et al. The herpes simplex virus type 1 strain 17 open reading frame RL1 encodes a polypeptide of apparent M(r) 37K equivalent to ICP34.5 of *herpes simplex virus type 1* strain F. J Gen Virol, 74: 2493-7, 1993.

16. Merrick WC. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiol Rev, 56: 291-315, 1992.

17. Stark GR.; Kerr IM.; Williams BR.; Silverman RH.; et al. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem, 67: 227-64, 1997.

18. Wu S.; Kumar KU.; Kaufman RJ. Identification and requirement of three ribosome binding domains in dsRNA-dependent protein kinase (PKR). Biochemistry, 37: 13816-26, 1998.